

Charakterisierung und Modifikation regulatorischer T-Zellen während der mCMV- Infektion

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Dipl. Biol. Nils Hagen Jost

aus Düsseldorf

Februar 2014

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Wiebke Hansen

2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Timm

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Ralf Küppers

Tag der mündlichen Prüfung: 03.Juni.2014

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
1.1	Das Immunsystem.....	7
1.1.1	Das angeborene Immunsystem.....	7
1.1.2	Das adaptive Immunsystem	8
1.2	T-Lymphozyten.....	9
1.2.1	T-Helferzellen.....	9
1.2.2	Zytotoxische T-Zellen (CTL, engl.: <i>cytotoxic T-lymphocyte</i>).....	11
1.2.3	T-Zellaktivierung und periphere Toleranzmechanismen	11
1.3	Regulatorische T-Zellen.....	13
1.3.1	Induzierte regulatorische T-Zellen	15
1.3.2	Suppressionsmechanismen regulatorischer T-Zellen	16
1.4	Herpesviren	19
1.4.1	Cytomegalieviren	20
1.4.2	Murines Cytomegalievirus	22
1.4.3	Immunevasionsstrategien von mCMV	24
1.4.4	Regulatorische T-Zellen während Cytomegalieviren-Infektionen	26
1.5	Zielsetzung	28
2	Material und Methoden	29
2.1	Mauslinien	29
2.1.1	Tierhaltung	29
2.1.2	Balb/c.....	29
2.1.3	Foxp3-GFP	29
2.1.4	DEREG	29
2.1.5	IL-10-GFP	29
2.1.6	IL10flx x IL CD4cre.....	30
2.1.7	FIC x IL-10flx.....	30

2.1.8	Thy 1.1	31
2.2	mCMV Smith Stamm	31
2.3	Chemikalien	31
2.4	Kulturmedien, Puffer und Lösungen	32
2.4.1	Kulturmedien	32
2.4.2	Puffer	33
2.4.3	Lösungen	34
2.5	Primer, DNA-Marker, Enzyme, Antikörper und Peptide	34
2.5.1	Primer	34
2.5.2	Enzyme und DNA-Marker	35
2.5.3	Antikörper	35
2.5.4	Peptide	37
2.5.5	Standardkits	37
2.6	Geräte	37
2.7	Molekularbiologische Methoden	38
2.7.1	Genotypisierung transgener Mauslinien	38
2.7.2	Agarosegelelektrophorese	40
2.7.3	Isolierung von Gesamt-RNA	40
2.7.4	cDNA-Synthese (Reverse Transkription)	41
2.7.5	Quantitative Real-Time PCR	41
2.8	Zellbiologische Methoden	43
2.8.1	Isolation von Einzelzellsuspensionen aus der Milz	43
2.8.2	Isolation von Lymphozyten aus der Lunge und den Speicheldrüsen	43
2.8.3	Bestimmung der Zellzahl	43
2.8.4	Durchflusszytometrie	44
2.8.5	Antikörperfärbung für die durchflusszytometrische Messung	44
2.8.6	Generierung von bestrahlten APCs	45
2.8.7	Isolierung von CD4 ⁺ T-Zellen	46

2.8.8	PKH26-Markierung von Lymphozyten	46
2.8.9	<i>In vitro</i> Proliferationstest	46
2.8.10	<i>In vitro</i> Inhibitionstest	47
2.8.11	Messung von Zytokinen im Blut	47
2.8.12	Herstellung von Organsuspensionen	47
2.8.13	GTKO-Zellkultur	48
2.8.14	Bestimmung der Viruslast in Lungen und Speicheldrüsen	48
2.9	Tierexperimentelle Methoden	49
2.9.1	Herstellung von infektiösen murinen Cytomegalieviren	49
2.9.2	Depletion von Foxp3 ⁺ regulatorischen T-Zellen durch Injektion von Diphtherie-Toxin 49	
2.9.3	Infektion der Mäuse mit mCMV Smith strain	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Kinetik der T-Zellantwort während der akuten mCMV-Infektion	50
3.2	Depletion Foxp3 ⁺ regulatorischer T-Zellen während der akuten mCMV-Infektion	61
3.3	Interleukin 10 Expression während der akuten mCMV-Infektion	69
3.4	Die T-Zellspezifische Inaktivierung der IL-10 Expression führt nach mCMV-Infektion zu einer Verringerung der Viruslast in den Speicheldrüsen	73
3.5	Die Treg-spezifische Inaktivierung von IL-10 hat keinen Einfluss auf die Viruslast während der akuten mCMV-Infektion	79
4	Diskussion	83
5	Zusammenfassung	95
6	Literatur	97
7	Verzeichnisse	112
7.1	Abkürzungsverzeichnis	112
7.2	Abbildungsverzeichnis	115
7.3	Tabellenverzeichnis	117
	Lebenslauf	118

Danksagung	120
Erklärung.....	121

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem hält die Integrität des Organismus aufrecht, indem es Schutz gegenüber Infektionen bietet und entartete körpereigene Zellen gezielt eliminiert. Die Unterscheidung zwischen Körpereigenem und Körperfremden stellt einen wichtigen Prozess dar. Eine Störung dieser Immunregulation kann zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen oder Immunpathologien führen (Sakaguchi und Sakaguchi, 2005; Murphy, 2011). Daneben ist das Immunsystem unabdingbar, um Infektionen durch Pathogene zu bekämpfen. Die Bandbreite an Krankheitserregern reicht von Bakterien über Viren bis hin zu Pilzen und mehrzelligen Parasiten. Gegen die meisten infektiösen Mikroorganismen hat das Immunsystem effektive Abwehrmechanismen entwickelt. So unterscheidet man bei Wirbeltieren das angeborene von dem adaptiven Immunsystem. Letzteres stellt eine evolutionäre Weiterentwicklung gegenüber den Wirbellosen dar und ermöglicht eine schnelle Reaktion auf eine bereits bekannte Infektion über das sogenannte immunologische Gedächtnis (Murphy, 2011).

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Sobald Pathogene in den Körper eingedrungen sind, stellt das angeborene Immunsystem die erste Verteidigungsfront dar. Es bekämpft die Krankheitserreger sofort und ermöglicht häufig eine schnelle, asymptomatische Eliminierung. Neben den Makrophagen und Granulozyten (Neutrophile, Basophile und Eosinophile) gehören natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Dendritische Zellen (engl.: *dendritic cells*, DC) zu den Zellen des angeborenen Immunsystems (Murphy, 2011). Als zusätzliche Komponenten sind Komplementsystem und verschiedene Blutproteine, wie antimikrobielle Peptide und Defensine, zu nennen (Frank und Fries, 1991; Risso, 2000). Makrophagen, DCs und Neutrophile erkennen über sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (engl.: *pattern recognition receptors*, PRR) konservierte Muster (engl.: *pathogen associated molecular pattern*, PAMPs,) von Krankheitserregern. Zu diesen Rezeptoren gehören unter anderem die Mitglieder der Toll-ähnlichen Rezeptoren (engl.: *toll-like receptors*, TLR) oder auch der *Scavenger* („Straßenfeger“- Rezeptor-Familie (Peiser et al., 2002; Creagh und O'Neill, 2006). Sie liegen hochkonserviert im Genom vor und mehrere Immunzellen können denselben Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren. Darüber hinaus können mehrere dieser Rezeptoren zusammen auf einer Zelle vorkommen. Die Bindung an PRRs führt zur Aktivierung der Immunzellen und in Folge u.a. zur Produktion von Chemokinen, die weitere Immunzellen zum Ort der Infektion rekrutieren (Murphy, 2011). Makrophagen und DCs sind in der Lage Pathogene zu phagozytieren und zu lysieren. Durch die Aktivierung migrieren die DCs zum nächsten Lymphknoten und beginnen Peptide der

Proteine phagozytierter Pathogene zu prozessieren. Die dadurch erhaltenen Antigene werden an Haupthistokompatibilitätskomplexe (engl.: *major histocompatibility complex*, MHC) gebunden und auf der Oberfläche präsentiert. Dieser Schritt verbindet die angeborene mit der spezifischen Immunantwort (Banchereau et al., 2000). T-Zellen, als Komponenten der adaptiven Immunantwort, sind nur dann in der Lage Antigene über ihren T-Zellrezeptor zu erkennen, wenn diese auf MHCs präsentiert werden.

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Neben den bereits angesprochenen T-Zellen gehören auch B-Zellen zum adaptiven Immunsystem. Beide Lymphozyten-Zelltypen gehen aus Vorläuferzellen im Knochenmark hervor. T-Zellen verlassen als Vorläufer-T-Zellen das Knochenmark und migrieren in den Thymus, wo sie weiter reifen. B-Zellen reifen innerhalb des Knochenmarks aus und verlassen es als naive B-Zellen (Ye und Graf, 2007). Beide Zelltypen besitzen auf ihrer Oberfläche einen spezifischen Rezeptor (engl.: *T-cell receptor*, TCR auf T-Zellen; engl.: *B-cell receptor*, BCR auf B-Zellen) mit dem sie Antigene erkennen können. Diese Rezeptoren werden über Rekombinationsprozesse der kodierenden Gensegmente (V(D)J-Rekombination) gebildet, was zu einer Vielzahl unterschiedlicher Spezifitäten führt, wodurch ein Rezeptor gegen nahezu jedes mögliche Antigen gebildet werden kann (Grawunder et al., 1998). Jede naive T-Zelle/ B-Zelle exprimiert nur einen TCR/ BCR mit einer spezifischen Antigenbindestelle. Diese Umstände unterscheiden die Rezeptoren des adaptiven Immunsystems von denen des angeborenen Immunsystems und machen eine spezifische Immunantwort, die nur gegen den erkannten Krankheitserreger gerichtet ist, erst möglich. Nachdem B-Zellen über ihren BCR ihr Antigen erkannt haben, beginnen sie damit Antikörper mit derselben Spezifität wie ihr BCR zu bilden und zu sezernieren. In Folge der sogenannten Keimzentrumsreaktion wird die Spezifität des Antikörpers durch somatische Mutation weiter gesteigert und die B-Zelle reift zur Plasmazelle aus. B-Zellen sind somit durch ihre Antikörperproduktion wichtig für die humorale (antikörpervermittelte) Immunantwort. Die gebildeten Antikörper der fünf Immunglobulin (Ig) Hauptisotypen (IgA, IgD, IgE, IgG und IgM) setzen unterschiedliche Folgereaktionen in Gang. So sind IgG-Antikörper beispielsweise durch Bindung an Oberflächenmoleküle von Krankheitserregern in der Lage diese durch Induktion des Komplementsystems abzutöten. T- und B-Zellen zirkulieren über das Blut und die Lymphe durch den Organismus. Sie sind in großen Mengen besonders in den sekundären lymphatischen Organen wie Milz, Lymphknoten, darm- und bronchial-assoziierten lymphatischen Organen nachzuweisen. Sie passieren diese Organe immer wieder bis sie auf ihr Antigen, oder im Falle einer T-Zelle eine aktivierte APC treffen, die ein passendes Antigen für ihren Rezeptor präsentiert und sie aktiviert (zusammengefasst in Murphy, 2011).

1.2 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten gehören zum adaptiven Immunsystem und reifen im Thymus, dem sie ihren Namen verdanken, zu naiven Thymus-Zellen (T-Zellen) heran. Innerhalb des Thymus wird ähnlich dem BCR der T-Zellrezeptor gebildet. Eine wichtige Station während der Reifung ist die Selektion der T-Zellen. Sie ist in die positive und die negative Selektion unterteilt. Im ersten Schritt werden T-Zellen, deren TCR eigene MHC Komplexe erkennen, positiv selektioniert. Der T-Zellrezeptor kann durch die Rekombinationsereignisse bei seiner Entstehung eine Vielzahl möglicher Antigene binden. Um die Selbsttoleranz des Körpers aufrechtzuerhalten, ist die negative Selektion von T-Zellen, die mit ihren TCRs körpereigene Strukturen erkennen, der zweite Schritt in der T-Zellselektion. Nach diesem Auswahlprozess gelangen die T-Zellen über die Blutbahn in den Organismus. Trotz der negativen Selektion gelangen wenige autoreaktive T-Zellen in die Zirkulation, weshalb sich weitere Mechanismen entwickelt haben mögliche Autoimmunreaktionen zu verhindern (siehe 1.2.3 und 1.3).

T-Lymphozyten werden in zwei Gruppen unterteilt. Anhand der Oberflächenmarker CD (engl.: *Cluster of Differentiation*) 4 und CD8 werden sie voneinander unterschieden. Die TCR von CD4⁺ T-Zellen können ihr Antigen nur dann erkennen, wenn es an ein MHC Komplex der Klasse II (MHC-II) gebunden präsentiert wird, während CD8⁺ T-Zellen eine Bindung an MHC-I benötigen. Die Gruppe der CD4⁺ T-Zellen – auch T-Helferzellen (T_H) genannt – wird in verschiedene Untergruppen wie T_H1, T_H2, T_H9, T_H17, T_H22 und regulatorische T-Zellen aufgeteilt. Jede naive T-Zelle kann sich in eine dieser Untergruppen differenzieren. Dabei hängt es von den Bedingungen in ihrer Umgebung ab, zu welcher Art T-Helferzelle sie sich entwickelt.

1.2.1 T-Helferzellen

Bei einer viralen oder bakteriellen Infektion produzieren Makrophagen und Monozyten des angeborenen Immunsystems große Mengen an Interleukin 12 (IL-12). Dies führt zusammen mit Interferon γ (IFN γ) und der Stimulation des TCR und kostimulatorischer Moleküle zur Expression des Transkriptionsmarkers T-bet (engl.: *T-box transcription factor expressed in T cells*) und zur Produktion von IFN γ und IL-2 durch die T_H1-Zelle (Zhu und Paul, 2010). IL-2 und IFN γ aktivieren Makrophagen und sorgen so zu einer effektiven Bekämpfung der Pathogene. T_H1-Zellen können zusätzlich B-Zellen stimulieren einen Klassenwechsel der produzierten Antikörper in Richtung opsonierender Antikörper vorzunehmen. Damit sind T_H1-Zellen ein wichtiger Bestandteil der inflammatorischen Immunantwort und nehmen darüber hinaus Einfluss auf die humorale Immunantwort.

Die Anwesenheit von IL-4 führt bei gleichzeitiger TCR- und Kostimulation einer naiven T-Zelle zur Differenzierung zu einer T_H2-Zelle. Diese zweite Helfer T-Zellgruppe exprimiert die

Transkriptionsfaktoren GATA-3 und STAT-6 (engl.: *signal transducer and activator of transcription 6*) und produziert große Mengen an IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 (Zhu und Paul, 2010). Diese Zytokine stimulieren in B-Zellen die Produktion von IgM, IgA und IgE Antikörpern. T_H2-Zellen sind essentiell für eine effektive humorale Immunantwort gegenüber extrazellulären Parasiten.

Eine dritte Untergruppe der T-Helferzellen wurde erst 2005 entdeckt. In Anwesenheit von IL-6 und TGF- β (engl.: *transforming growth factor*) entwickeln sich naive T-Zellen zu den sogenannten T_H17-Zellen (Harrington et al., 2005). Diese Zellen sezernieren große Mengen an IL-17, was zu ihrem Namen geführt hat, sowie IL-6 und TNF (engl.: *tumor necrosis factor*). Durch die Stimulation der T-Zellen mit IL-6 und TGF- β wird die Expression an STAT3 (engl.: *signal transducer and activator of transcription*) erhöht. STAT3 steigert die Expression des Transkriptionsfaktors ROR γ t (engl.: *retinoid related orphan receptor*) über den T_H17-Zellen charakterisiert werden. Zusammen stimulieren sie die Bildung der Rezeptoren für IL-21 und IL-23. Die Anwesenheit von IL-21, IL-23 und TGF- β stimuliert letztlich die Produktion von IL-17, IL-6 und TNF (Zhou et al., 2007). T_H17-Zellen sind wichtig für eine effektive Immunantwort gegen extrazelluläre Bakterien und Pilzinfektionen und werden im Zusammenhang mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen diskutiert (Chen und O'Shea, 2008).

2008 ist durch Veldhoen et al. und Dardalhon et al. die Untergruppe der T_H9-Zellen erstmals beschrieben worden. Diese zeichnen sich durch die Expression des Zytokins IL-9 aus. Untersuchungen zeigen, dass IL-9 eine Rolle bei der Immunantwort gegen Helminthen-Infektionen und bei Allergien spielt (Khan et al., 2003; Veldhoen et al., 2008; Cheng et al., 2002). Ein direkter pathogener Effekt konnte im murinen EAE-Modell (engl.: *experimental autoimmune encephalomyelitis*) beobachtet werden (Jager et al., 2009). Es wird vermutet, dass auch bei T_H9-Zellen Gedächtnis-Zellen gebildet werden (Tan und Gery, 2012).

Kürzlich wurden T_H22-Zellen als Untergruppe der T-Helferzellen beschrieben, die über die Expression des Zytokins IL-22 charakterisiert werden (Eyerich et al., 2009). IL-22 steigert die antimikrobiellen Verteidigungsmechanismen von Hautkeratinozyten. Auch bei der Immunantwort gegen intestinale bakterielle Infektionen scheint die Expression von IL-22 eine entscheidende Rolle zu spielen. So ist in IL-22 KO-Mäusen eine erhöhte Mortalität bei der Infektion mit *Citrobacter rodentium* gezeigt worden (Zheng et al., 2008). T_H22 unterstützen darüber hinaus scheinbar auch die Integrität der Haut durch ihre Fähigkeit die Proliferation der Keratinozyten zu induzieren (Eyerich et al., 2009).

1.2.2 Zytotoxische T-Zellen (CTL, engl.: *cytotoxic T-lymphocyte*)

Eine der wichtigsten Komponenten der zellulären Immunantwort gegen virale Infektionen und Tumore sind zytotoxische T-Zellen (Zhang et al., 2009). Am eingehendsten sind hier die CD8⁺ CTLs untersucht worden. Sie gehen aus naiven CD8⁺ T-Zellen hervor und benötigen zur vollständigen Aktivierung einen ca. 3 tägigen Aktivierungsprozess, der die Expression von MHC-I und kostimulatorischen Molekülen auf APCs (engl.: *antigen presenting cell*, APC) benötigt (siehe 1.2.3) (Russell und Ley, 2002). Dabei kommt es zu einer Veränderung ihres Phänotyps, wodurch sie in die Lage versetzt werden, infizierte Zellen oder entartete Tumorzellen abzutöten. Sobald sie ihr Antigen auf einem MHC-I erkannt haben, treiben sie die Zielzelle in den kontrollierten Zelltod. CD8⁺ CTLs exprimieren große Mengen an Fas Ligand (FasL, CD95L) auf ihrer Oberfläche. Die Bindung an den Rezeptor CD95 auf Zielzellen löst deren Apoptose aus (Barry et al., 2000; Barry und Bleackley, 2002). Ein weiterer Mechanismus ist die Ausschüttung von Perforinen und Granzymen durch CTLs (Smyth und Trapani, 1995). Perforine machen die Zellmembran durchlässig für die Granzyme, die wiederum durch ihre proteolytische Aktivität Caspasen spalten und so die Apoptose in der Zielzelle induzieren. Neben CD8⁺ CTLs sind auch CD4⁺ CTLs beschrieben worden (Fleischer, 1984). Auch sie nutzen die gleichen Mechanismen wie CD8⁺ CTLs, um in ihren Zielzellen Apoptose zu induzieren. Gemäß ihrem Korezeptor CD4 ist ihre Zytotoxizität von Zellen mit MHC-II Expression abhängig (Marshall und Swain, 2011).

1.2.3 T-Zellaktivierung und periphere Toleranzmechanismen

Die Aktivierung von T-Zellen ist in mehrere Abschnitte unterteilt. Als erstes wandert eine naive T-Zelle in einen Lymphknoten oder ein lymphatisches Gewebe ein. Dabei ist das Oberflächenmolekül CD62L (L-Selectin) – in naiven T-Zell stark exprimiert – wichtig für das Einwandern und den Verbleib (engl.: *homing*) der T-Zellen in Lymphknoten (Hengel et al., 2003). Es bindet hierbei an CD34 und GlyCAM-1, exprimiert auf den Venolen mit hohem Epithel in den Lymphknoten, oder an MAdCAM-1, exprimiert auf den Endothelien der Schleimhäute. Dadurch kommt es in der Folge zur Diapedese der Zellen in die Gewebe der Lymphknoten, bzw. der mukosalen Lymphatischen Gewebe (Murphy, 2011). In diesen Geweben interagiert die naive T-Zelle mit aktivierten antigenbeladenen APCs (DCs, Makrophagen und B-Zellen) was zu ihrer Aktivierung führt. Das erste Signal in dieser Kette ist die antigenspezifische Aktivierung des T-Zellrezeptors. Der TCR ist mit CD3 verbunden und mit einem der beiden Korezeptoren CD4 oder CD8 assoziiert. Das Antigen muss hierbei an eines der zwei MHC Komplexe (MHC-I oder MHC-II) gebunden vorliegen. Als zweites Signal ist die Wechselwirkung von CD28 auf der T-Zelloberfläche mit kostimulatorischen Molekülen auf der APC notwendig. Als kostimulatorische Moleküle sind das Glykoprotein B7 – mit seinen zwei Varianten B7.1 und B7.2 (= CD80 und CD86) – nachgewiesen worden. Die

Bindung von CD28 führt in der T-Zelle zur Differenzierung in eine Effektorzelle (Chen und Flies, 2013). Als drittes Signal sind anwesende Zytokine wichtig für die Richtung der Differenzierung, also in welche der in den Abschnitten 1.2.1 und 1.2.2 angesprochenen Effektorzellen sich die aktivierte T-Zelle entwickelt. Ein weiteres kostimulatorisches Molekül auf reifen APCs ist CD40. Sein Ligand CD40L wird auf T-Zellen exprimiert. Die Bindung regt in den APCs eine Erhöhung der Produktion von B7-Molekülen an und führt zu einer verstärkten Aktivierung der T-Zelle (Schoenberger et al., 1998; Grewal und Flavell, 1998). Der mehrschrittige Aktivierungsprozess ist ein wichtiger Schutzmechanismus vor der Generierung autoreaktiver T-Zellen. APCs exprimieren kostimulatorische Moleküle nur nach Aktivierung, bspw. einer viralen Infektion. Somit können APCs körpereigene Moleküle auf MHC Komplexen präsentieren ohne ein sekundäres Signal an eine autoreaktive T-Zelle zu senden. Ohne kostimulatorisches Signal geht die T-Zelle in den Zustand der Anergie über, wodurch Immunpathologien verhindert werden können.

Nach der Aktivierung verändert die T-Zelle ihr Expressionsprofil. Das Oberflächenmolekül CD62L wird beispielsweise herunterreguliert. Durch den Verlust können T-Zellen den Lymphknoten verlassen und zum Ort der Infektion migrieren. Zusätzlich wird die Expression der α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) in aktivierten T-Zellen gesteigert. Der IL-2 Rezeptor besteht aus drei Untereinheiten (α , β und γ). Die β - und γ -Untereinheiten werden in naiven T-Zellen konstitutiv exprimiert und bilden einen IL-2 Rezeptor mit einer geringen Spezifität. Erst durch die zusätzliche α -Untereinheit wird ein Rezeptor mit hoher Spezifität gebildet (Taniguchi, 1992; Nelson und Willerford, 1998). Aktivierte T-Zellen benötigen IL-2 um in den Zellzyklus einzutreten und sich zu Effektorzellen zu differenzieren. Die Abwesenheit von IL-2 führt bei diesen Zellen zum Tod, weshalb IL-2 auch ein Überlebensfaktor aktivierter T-Zellen ist. Um auch bei geringen Mengen IL-2 zu proliferieren ist die Expression der α -Untereinheit in aktivierten T-Zellen von entscheidender Bedeutung (Murphy, 2011).

Damit eine Immunantwort wieder beendet werden kann, oder die periphere Toleranz aufrechterhalten werden kann, haben sich mehrere Mechanismen entwickelt. Nach Aktivierung regeln T-Zellen die Expression von CD28 herunter und exprimieren stattdessen das *Cytotoxic T-lymphocyte associated protein-4* (CTLA-4). Dieses bindet mit höherer Affinität an die B7-Moleküle auf den APCs und vermittelt ein inhibitorisches Signal an die T-Zelle (Lee et al., 1998). Wie bereits in Abschnitt 1.2 angesprochen verlassen auch autoreaktive T-Zellen den Thymus. Der einfachste Schutzmechanismus ist der der Ignoranz, bei dem das spezifische Antigen der T-Zelle nicht präsentiert wird. Ein weiterer Mechanismus ist der Aktivierungs-induzierte Zelltod (engl.: *activation-induced cell death*, AICD). Dieser stellt besonders in immunprivilegierten Arealen des Organismus, wie dem Gehirn oder Kornea, einen wichtigen Mechanismus dar, um Autoimmunerkrankungen zu verhindern. Wenn eine autoreaktive T-Zelle ihr Antigen über ihren TCR erkennt, erhält sie

unter normalen Bedingungen kein kostimulatorisches Signal und fällt in den Zustand der Anergie (zusammengefasst in Walker und Abbas, 2002). Neben diesen intrinsischen Mechanismen gibt es auch extrinsische wie die im Folgenden beschriebenen regulatorischen T-Zellen.

1.3 Regulatorische T-Zellen

Neben den in den vorangegangenen Abschnitten 1.2.1 und 1.2.2 beschriebenen T-Zelluntergruppen, die alle pro-inflammatorische Wirkung besitzen, existiert zusätzlich eine immunsuppressive Gruppe an T-Zellen. Die sogenannten regulatorischen T-Zellen (Tregs) sind für die Integrität des Organismus essentiell.

In den 1970er Jahren wurden erstmals T-Zellen beschrieben, welche die inflammatorischen Eigenschaften anderer T-Zellen negativ beeinflussten. Diese Zellen wurden als Suppressor T-Zellen bezeichnet (Gershon und Kondo, 1970; Gershon et al., 1972). Die Existenz dieser Suppressor T-Zellen wurde aufgrund fehlender phänotypischer Marker in den Folgejahren immer stark bezweifelt. Im Jahr 1995 konnten Sakaguchi et al. zeigen, dass $CD4^+$ T-Zellen, die die α -Untereinheit des IL-2-Rezeptors (CD25) stark exprimieren, immunsuppressive Eigenschaften besitzen. Die spezifische Depletion der $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen führte in Mäusen zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen (Sakaguchi et al., 1995). Um den vorherigen Disput über die Existenz der Suppressor T-Zellen zu vermeiden, bezeichnete Sakaguchi die Zellen als regulatorische T-Zellen. Allerdings konnten so Tregs noch immer nicht als Zellpopulation von anderen T-Zellen abgegrenzt werden, da auch Effektor T-Zellen nach Aktivierung verstärkt CD25 exprimieren. 2001 konnte im Menschen gezeigt werden, dass Patienten mit dem sogenannten IPEX-Syndrom (Immunderegulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie, X-gekoppeltem Syndrom) eine Mutation im *forkhead/winged-helix protein 3 (Foxp3)*-Gen aufweisen (Bennett et al., 2001). In der Maus kodiert das Gen für das Protein Scurfin (Brunkow et al., 2001). Eine Mutation führt in Mäusen zum „scurfy“-Phänotyp ähnlich dem von IPEX. Patienten und Mäuse mit einer solchen Mutation entwickeln in frühen Jahren bzw. Wochen Autoimmunkrankheiten. Im Jahr 2003 konnten gleich drei Forschergruppen Foxp3 als einen Marker für regulatorische T-Zellen nachweisen (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003; Khattri, 2003). Über diesen Marker können Tregs direkt innerhalb der $CD4^+$ T-Zellpopulation unter anderem durchflusszytometrisch erkannt und untersucht werden. Im Mausmodell hat dies bis heute Bestand. Im Menschen hingegen konnten auch $Foxp3^+$ Zellen nachgewiesen werden, die keinen suppressiven Phänotyp besitzen (Gavin et al., 2006; Ziegler, 2007). Daher bleibt eine genaue Quantifizierung regulatorischer T-Zellen im Menschen schwierig. Epigenetische Untersuchungen des *Foxp3*-Gens zeigen eine Sequenz, die in Tregs im Gegensatz zu Effektor-T-Zellen demethyliert ist (engl.: *Treg-specific demethylated region*, TSDR) (Floess et

al., 2007). Vor kurzem konnten Tatura et al. eine Methode zur Quantifizierung regulatorischer T-Zellen in Sepsispatienten etablieren. Dabei wird die Menge an Tregs über die Menge an demethyliertem TSDR quantifiziert (Tatura et al., 2012). Weitere Studien zu Tregs zeigten, dass sie ca. 5-10 % des CD4⁺ T-Zellpools in der Maus ausmachen und eine sehr heterogene Gruppe darstellen. Wie die Effektor-T-Zelle benötigt auch die Treg-Zelle die Stimulation ihres T-Zellrezeptors, um ihre in dem Fall suppressiven Eigenschaften zu entfalten. Nach Aktivierung erfolgt die Suppression allerdings antigen-unspezifisch (Sakaguchi et al., 1995; Thornton und Shevach, 2000). Die Liste der Zelltypen, die von Tregs beeinflusst werden, reicht von Effektor-T-Zellen, NK- und NK T-Zellen bis hin zu APCs wie DCs, B-Zellen und Makrophagen (Schmetterer et al., 2012).

Neben CD25 und Foxp3 sind weitere Markermoleküle beschrieben worden, die auf den Zellen der Treg-Population exprimiert werden. Hierzu zählt CTLA-4. Eine spezifische Depletion von CTLA-4 in Tregs führt zu verstärkter Proliferation von Lymphozyten und in Folge zu T-Zellvermittelten Autoimmunerkrankungen (Wing et al., 2008). Auch der Glucocorticoid-induzierte Tumor Nekrose Faktor (GITR) wird konstitutiv auf Tregs exprimiert. Wie CTLA-4 wirkt auch GITR negativ auf die Funktion von Effektor-T-Zellen (Shimizu et al., 2002). Weitere Subpopulationen der regulatorischen T-Zellen exprimieren CD103, den E-Cadherin Liganden. Dieser ist hauptsächlich auf T-Zellen des mukosalen Epithels exprimiert (Kilshaw und Murrant, 1990), wird aber auch von Tregs gebildet und ermöglicht ihnen u.a. die Infiltration in den Tumor (Anz et al., 2011; Suffia et al., 2005). Als zusätzlichen Marker muriner regulatorischer T-Zellen konnten Bruder et al. 2004 den Rezeptor Neuropilin-1 (Nrp-1) identifizieren. Dieser wird auch nach Aktivierung nicht von CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen gebildet (Bruder et al., 2004). Im humanen Immunsystem wurde mit GARP (engl.: *glycoprotein-A repetitions predominant*) ebenfalls ein Marker nachgewiesen, der auf Tregs nicht aber auf T_H-Zellen exprimiert wird (Probst-Kepper et al., 2009). Neben den regulatorischen CD4⁺ T-Zellen sind auch CD8⁺ Tregs und regulatorische B-Zellen (Bregs) beschrieben worden (Xystrakis et al., 2004). Während CD4⁺ und CD8⁺ Tregs für die Suppression verschiedene Mechanismen nutzen, scheinen regulatorische B-Zellen hauptsächlich über die Sekretion von IL-10 ihr inhibitorisches Potenzial zu entfalten (Xystrakis et al., 2004).

Bei einer Vielzahl immunologischer Prozesse übernehmen Tregs regulatorische Aufgaben. Bei Autoimmunerkrankungen wie Typ-1 Diabetes (Sakaguchi et al., 2001) oder chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (engl.: *inflammatory bowel disease*, IBD) (Coombes et al., 2005) konnte ein positiver Einfluss regulatorischer T-Zellen für den Patienten nachgewiesen werden. Auch während Transplantationen können Tregs Abstoßungsreaktionen mildern und den Ausbruch von Autoimmunerkrankungen verhindern (zusammengefasst in Kang et al., 2007). Neben diesen positiven Einflüssen regulatorischer T-Zellen auf unerwünschte oder zu starke Immunantworten, können sich die suppressiven Eigenschaften der Tregs aber auch

ungünstig auf den Verlauf von Krankheiten auswirken. So supprimieren Tregs beispielsweise effektive Immunantworten, die zur Bekämpfung von Tumoren essentiell sind (Dunn et al., 2004). 2012 konnten Hansen et al. ein spezifisches Rezeptor-abhängiges Einwandern von Tregs in Tumorgewebe nachweisen (Hansen et al., 2012). Die Deletion dieses spezifischen Rezeptors (Neuropilin-1) führte zur verminderten Einwanderung der Tregs in Tumore was zu einer erhöhten anti-tumoralen Immunantwort und somit zu einem deutlich verminderten Tumorwachstum führte (Hansen et al., 2012).

Bei der Suppression nutzen Tregs ein großes Portfolio an Mechanismen, die in Abschnitt 1.3.2 näher beschrieben werden.

1.3.1 Induzierte regulatorische T-Zellen

Neben den sogenannten natürlichen Tregs (nTregs), die den Thymus als regulatorische T-Zelle verlassen, sind auch induzierte Tregs (iTregs), die in der Peripherie aus naiven T-Zellen entstehen, beschrieben (Murphy, 2011). Sie werden heute teilweise als TGF- β -exprimierende T_H3 - und IL-10-produzierende T_R1 -Untergruppen induzierter Tregs zusammengefasst (Gol-Ara et al., 2012). Groux et al. konnten 1997 durch wiederholte Stimulation aus humanen und murinen naiven $CD4^+$ T-Zellen in Anwesenheit von IL-10 *in vitro* eine Zellpopulation mit suppressiven Eigenschaften generieren. Diese, als T_R1 bezeichneten Zellen, produzierten nach Aktivierung selbst große Mengen an IL-10 und konnten in einem induzierten *in vivo* Kolitis-Modell durch die Inhibition antigenspezifischer Immunantworten die Erkrankung verhindern. Neben IL-10 produzierten T_R1 -Zellen TGF- β , IL-5 und IL-2 aber kein IL-4 (Groux et al., 1997). Auch *ex vivo* und *in vivo* können antigenspezifisch T_R1 -Zellen generiert werden (Roncarolo et al., 2006). So können mit TGF- β oder IL-10 behandelte DCs, naive $CD4^+$ T-Zellen zu T_R1 -Zellen konvertieren (Jonuleit et al., 2000; Rutella et al., 2006). Auch Pathogene wie das gramnegative Bakterium *Bordetella pertussis* sind in der Lage, über die Induktion der IL-10 Produktion in DCs, regulatorische T-Zellen (T_R1) zu induzieren (McGuirk et al., 2002).

In anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die orale Gabe von geringen Mengen an löslichen Antigenen zur Induktion von Toleranz gegenüber dem Antigen führt. Hierbei kommt es zur Bildung einer T-Helferzellgruppe mit suppressiven Eigenschaften. Die sogenannten T_H3 -Zellen produzieren große Mengen an TGF- β und wenig IL-4 und IL-10. Sie lassen sich somit von den zuvor beschriebenen T_R1 -Zellen abgrenzen. Ihr suppressives Potential basiert auf der Ausschüttung von TGF- β , welches die Aktivierung von T_H1 - und T_H2 -Zellen inhibiert (Weiner, 2001). *In vivo* sind T_H3 -Zellen in der Lage eine autoimmune Enzephalitis zu verhindern (Chen et al., 1994). T_R1 - und T_H3 -Zellen sind die bislang am besten beschriebenen Subpopulationen an induzierten Tregs. Allerdings ist in beiden die Expression von Foxp3, dem Marker regulatorischer T-Zellen, umstritten (zusammengefasst

in Gol-Ara et al., 2012). 2004 konnten erstmals antigeninduzierte IL-10 produzierende und immunsuppressive Foxp3⁺ T-Zellen generiert werden (Vieira et al., 2004). Darüber hinaus konnten Hansen et al. unter dauerhafter Stimulation *in vivo* mit einem spezifischen Antigen eine Induktion von Foxp3⁺CD25⁺ Tregs nachweisen, die *in vivo* und *in vitro* suppressiv wirken (Hansen et al., 2007).

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass auch Foxp3⁺ Treg-Zellen aus naiven T-Zellen über einen Mechanismus, der die Anwesenheit von Retinsäure, TGF- β und DCs benötigt, generiert werden können. In der Lamina Propria des Dünndarms und den mesenterischen Lymphknoten sind CD103⁺ DCs beschrieben worden, die Retinsäure und TGF β produzieren (Coombes et al., 2007; Sun et al., 2007; Mucida et al., 2009). Bereits zuvor ist gezeigt worden, dass TGF- β die Expression von CD103 reguliert (Lim et al., 1998). Darüber hinaus konnte im Darm gezeigt werden, dass kommensale Bakterien einen Einfluss auf die Induktion und/oder Expansion von Tregs haben. Es wird spekuliert, dass iTregs ein Ergebnis der Koevolution des adaptiven Immunsystems mit kommensalen Bakterien und über die Nahrung aufgenommener Antigene sind (Curotto de Lafaille und Lafaille, 2009). Diese iTregs stellen eine heterogene Gruppe dar und besitzen ähnliche immunsuppressive Eigenschaften wie die nTregs.

1.3.2 Suppressionsmechanismen regulatorischer T-Zellen

Untersuchungen regulatorischer T-Zellen während Immunantworten haben viele verschiedene Mechanismen identifiziert, über die Tregs inhibierend wirken. Bei einigen der Mechanismen werden immunsuppressive Zytokine ausgeschüttet, während bei anderen ein Zell-Zell-Kontakt zwischen regulatorischer T-Zelle und Zielzelle notwendig ist. Auch ein aktives Abtöten von Zielzellen durch Tregs ist beschrieben worden.

Allerdings konnten einige *in vitro* entdeckte Mechanismen *in vivo* noch nicht nachgewiesen werden und so sind bis heute die exakten Zusammenhänge umstritten. In Abbildung 1.1 sind einige bereits beschriebene Mechanismen graphisch dargestellt. Regulatorische T-Zellen sezernieren in verschiedenen Szenarien die anti-inflammatorischen Zytokine TGF- β , IL-35 und IL-10 (Abb. 1.1). Es konnte gezeigt werden, dass TGF- β die Expression der Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-bet in T-Zellen oder die Aktivierung von Makrophagen inhibieren, was zu einer Unterdrückung der inflammatorischen Immunantwort führt (Heath et al., 2000; Gorelik et al., 2002; Vignali et al., 2008). Obwohl für IL-35 eine inhibitorische Wirkung auf T-Zellen nachgewiesen werden konnte, ist der genaue Wirkmechanismus noch unbekannt (Collison et al., 2007). Die inhibitorische Wirkung von IL-10 wird im folgenden Kapitel genauer erklärt. Wie bereits für IL-10 und TGF- β in Kapitel 1.3.1 beschrieben, kann auch die Anwesenheit von IL-35 zur Induktion von Tregs führen (Collison et al., 2010).

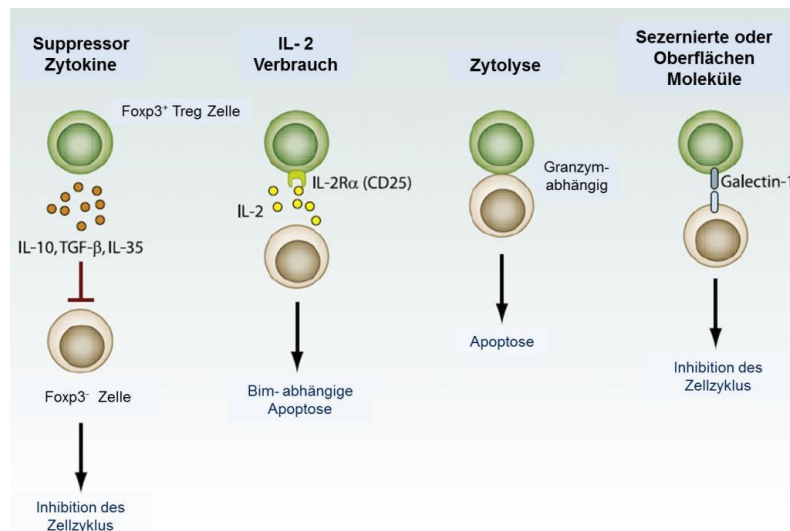


Abbildung 1.1: Suppressionsmechanismen regulatorischer T-Zellen auf T-Zellen. Dargestellt sind grundlegende Mechanismen, über die Tregs T-Zellen beeinflussen: Suppression durch die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine; IL-2 Limitierung; Granzym-abhängige Zytolyse; Suppression über Oberflächenmoleküle (Modifiziert nach Shevach, 2009).

Pandiyar et al. postulierten 2007 die Möglichkeit, dass Tregs über ihren hochaffinen Rezeptor den Wachstumsfaktor IL-2 verbrauchen. Da Effektorzellen auf IL-2 angewiesen sind, führt ein Mangel zur Induktion von Apoptose der Effektorzellen und so zur Suppression von Immunantworten (Abb.1.1) (Pandiyar et al., 2007).

2002 konnten in murinen Tregs die Expression von GzmB und 2004 größere Mengen an GzmA in humanen Tregs nachgewiesen werden (McHugh et al., 2002; Grossman et al., 2004). Gondek et al. wiesen 2005 *in vitro* eine geringere suppressive Fähigkeit von Tregs aus GzmB-KO Mäusen nach (Gondek et al., 2005). Zusätzlich zeigten sie, dass dieser Mechanismus Perforin-unabhängig ist. Die GzmB-vermittelte Apoptose-Induktion von Tregs konnte auch *in vivo* in einem Tumormodell nachgewiesen werden (Cao et al., 2007). Diese war aber anders als bei den *in vitro* Daten Perforin-abhängig.

Als ein weiteres inhibitorisches Molekül regulatorischer T-Zellen ist Galectin-1 beschrieben worden. Es gehört zur Familie der β -Galactosid-bindenden Proteine. Es wird als Homodimer sekretiert und führt durch Bindung an verschiedene Rezeptoren in T-Zellen zur Einstellung des Zellzyklus oder zur Apoptose und auch zur Unterdrückung der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (Garin et al., 2007). Bislang ist nicht bekannt ob Galectin-1 als lösliches Zytokin oder via Zell-Zellkontakt wirkt.

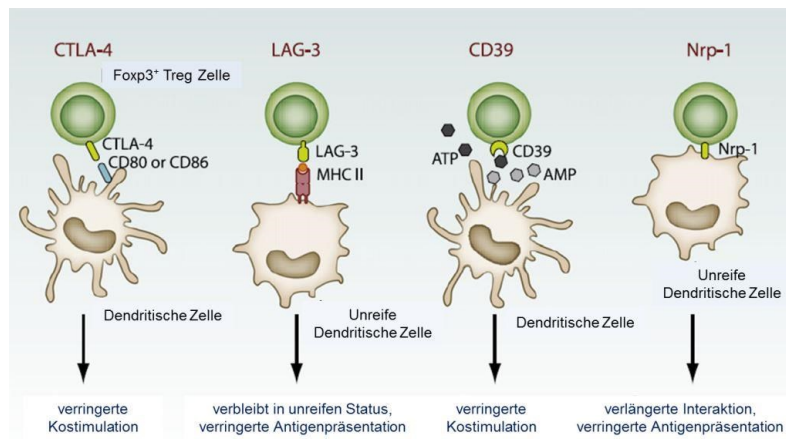


Abbildung 1.2: Suppressionsmechanismen regulatorischer T-Zellen auf Dendritische Zellen. Dargestellt sind grundlegende Mechanismen, über die Tregs Dendritische Zellen beeinflussen: Verringerung der kostimulatorischen Kapazität durch die Bindung an Oberflächenmoleküle (CTLA-4, Lag-3 oder Nrp-1); Eingriff in den Metabolismus durch Erhöhung des AMP-Spiegels im Extrazellulärraum (Modifiziert nach Shevach, 2009).

Wie bereits erwähnt wurde beruht die Wirkung von Tregs nicht immer direkt auf einer Interaktion mit Effektor-Zellen. Häufig manipulieren regulatorische T-Zellen APCs und supprimieren somit die Immunantwort der T-Zellen am Punkt ihrer Aktivierung. Abbildung 1.2 stellt diese Mechanismen zusammengefasst dar.

So besitzen Tregs das Molekül CTLA-4 auf ihrer Oberfläche. Dieses interagiert mit den kostimulatorischen B7-Molekülen auf APCs. Dadurch werden Bindestellen für Effektor T-Zellen besetzt und eine effektive Aktivierung unterbunden. Zusätzlich fördert die Bindung die Produktion von Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) in DCs. IDO induziert pro-apoptotische Moleküle in Effektor T-Zellen und führt diese somit in den kontrollierten Zelltod (Read et al., 2000; Fallarino et al., 2003; Mellor et al., 2004). Als weiteres Oberflächenmolekül auf Tregs kann Lag-3 (engl.: *lymphocyte activation gene-3*), als CD4-Analogon, mit MHC-II auf DCs in Kontakt treten. Die Interaktion zwischen Lag-3 und MHC-II verhindert die Reifung von DCs, wodurch diese sich nicht zu effektiven APCs ausbilden können (Liang et al., 2008) (Abb. 1.2). Tregs können auch in den Metabolismus ihrer Zielzellen eingreifen. So exprimieren sie das Molekül CD39 auf ihrer Oberfläche. CD39 ist ein Ektoenzym und hydrolysiert ATP oder ADP zu AMP (Shevach, 2009). Das gebildete AMP bindet auf der Zielzelle an A2A-Adenosinrezeptoren und stört die Funktion von DCs und Effektor T-Zellen (Deaglio et al., 2007). Neuropilin (Nrp-1) ist ein Korezeptor für den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor und wird auf Tregs exprimiert (Bruder et al., 2004). Nrp-1 führt zu einer verlängerten Bindung von Tregs an undifferenzierte DCs (Abb. 1.2) (Sarris et al., 2008). Der Einsatz eines blockierenden Antikörpers gegen Nrp-1 führte zu einem kompletten Verlust der Inhibition der Proliferation von T-Zellen, die mit geringen Konzentrationen an Antigen stimuliert wurden (Shevach, 2009). Yadav et al. und Weiss et al. zeigten 2012, dass die

Expression von Nrp-1 bei Treg-Populationen unterschiedlich ist. Nach ihren Untersuchungen exprimieren natürliche Tregs hohe Mengen an Nrp-1, während induzierte regulatorische T-Zellen wenig Nrp-1 auf ihrer Oberfläche tragen (Weiss et al., 2012; Yadav et al., 2012). Somit wurde postuliert, dass die beiden Treg-Populationen aufgrund der Nrp-1 Expression unterschieden werden können.

Insgesamt zeigen diese Untersuchungen, dass die Funktionsweise von Tregs sehr vielfältig ist, wobei man davon ausgeht, dass die eingesetzten Mechanismen von Tregs stark von der Art der Immunantwort und dem betroffenen Organ abhängen (Rubtsov et al., 2008).

1.4 Herpesviren

Die Familie der *Herpesviridae* umfasst einige der unter Menschen am weitesten verbreiteten Viren. Ihre Vertreter werden aufgrund ihrer isokaedrischen Kapsidarchitektur in die Unterfamilien der α -, β - und γ -Herpesviren unterteilt, wobei diese gewisse Gemeinsamkeiten aufweisen:

1. Herpesviren sind sehr wirtsspezifisch und infizieren ein großes Spektrum an Zelltypen, wie beispielsweise Epithelzellen, Monozyten, Makrophagen, B- und T-Zellen und Nervenzellen.
2. Sie besitzen ein Genom aus doppelsträngiger DNA (dsDNA), die für eine große Anzahl an viralen Enzymen kodiert, die wichtig für die DNA-Synthese und Prozessierung von viralen Proteinen sind.
3. Die Vermehrung der viralen DNA und die Synthese des Kapsids verlaufen innerhalb des Nukleus der Wirtszelle.
4. Herpesviren sind lytische Viren, die bei der Freisetzung der neu gebildeten Viruspartikel die Wirtszellen zerstören.
5. Herpesviren sind in der Lage eine latente Infektion in ihrem Wirt zu etablieren. Während der latenten Infektion liegt das Virusgenom zirkulär geschlossen vor und nur wenige Gene werden in dieser Phase exprimiert. Dabei unterscheidet sich der Zelltropismus, also der infizierte Zelltyp, bei den verschiedenen Herpesviren.

Humanpathogene α -Herpesviren sind beispielsweise das Herpes-Simplex-Virus-1 (HSV-1), der Verursacher des Lippenherpes, oder das Varizella-Zoster-Virus (VZV), welches die sogenannten Windpocken auslöst. Zu den γ -Herpesviren wird unter anderem das Epstein-Barr-Virus (EBV) gezählt. Die akute Infektion mit EBV löst das Pfeiffersche Drüsenfieber aus. Innerhalb der β -Herpesviren sind insgesamt drei Humanpathogene bekannt. Der bekannteste Vertreter ist das Cytomegalievirus (CMV) (Murphy, 2011).

1.4.1 Cytomegalieviren

Das zur β -Herpesviren-Familie gehörende Cytomegalievirus (CMV) konnte 1954 das erste Mal von Smith und Kollegen aus murinen Speicheldrüsen isoliert werden (Smith, 1954). Wenige Jahre später gelang es drei unabhängigen Forschergruppen das humane CMV (hCMV) aus den Speicheldrüsen infizierter Menschen zu gewinnen (Smith, 1956; Rowe et al., 1956; Craig et al., 1957). Zu dieser Zeit wurde das Virus noch als Speicheldrüsen-Virus bezeichnet. Die Umbenennung in Cytomegalievirus erfolgte 1960 (Weller et al., 1960).

Die akute Infektion in gesunden Personen ist meist asymptomatisch, es kann allerdings manchmal eine Mononukleose beobachtet werden (Taylor, 2003). Für die Diagnose einer hCMV-Infektion sind neben der Isolation des Virus aus akut infizierten Patienten verschiedene weitere Techniken entwickelt worden. So können CMV-spezifische Antikörper mittels ELISA (engl.: *enzyme-linked immunosorbent assay*) im Blut nachgewiesen werden (Gleaves et al., 1985). Auch lassen sich CMV-spezifische Proteine durch den Einsatz monoklonaler Antikörper in Proben nachweisen (Boeckh et al., 1992). Mittels PCR und quantitativer Real-Time PCR Techniken ist es möglich, CMV-DNA bzw. die mRNA CMV-spezifischer Gene im Blut zu messen (Rasmussen et al., 1997; Spector et al., 1998; Einsele et al., 2000; Boeckh et al., 2004). Mikroskopisch lässt sich die Infektion am Auftreten der sogenannten Eulenaugenzellen nachweisen (Abb. 1.3). Dabei kommt es in infizierten Zellen zu einer starken Zellvergrößerung (Cytomegalie) und zur Bildung plasmatischer Einschlusskörperchen (engl.: *inclusion bodies*).

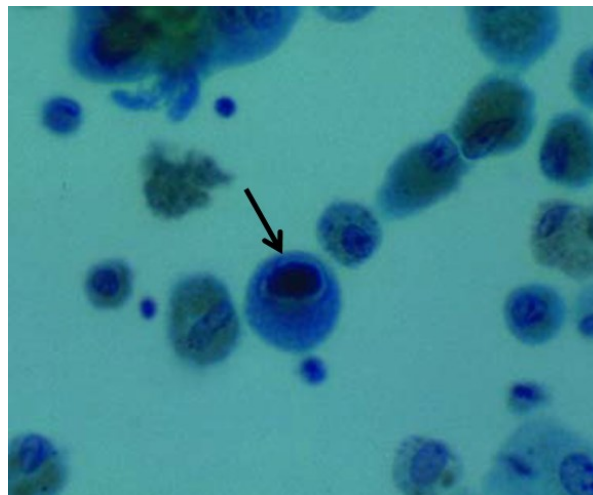


Abbildung 1.3: Eulenaugenzelle während einer hCMV-Infektion. Gezeigt sind Zellen einer Lungenbiopsie eines hCMV-infizierten Patienten. Der Pfeil deutet auf eine Zelle mit klassischen Eulenaugen-Einschlusskörperchen (engl.: *owl's eye inclusion bodies*) (Modifiziert nach Taylor, 2003).

Die Primärinfektion mit dem Cytomegalievirus erfolgt meist über einen Kontakt mit Sekreten eines infizierten Individuums. Über Monozyten, neutrophile Leukozyten und zirkulierende Endothelzellen wird das Virus vermutlich über die Blutbahn im Organismus verbreitet (Sinzger und Jahn, 1996; Plachter et al., 1996). Das Virus kann anschließend mehrere

Organen wie Speicheldrüse, Niere, Nebenniere, Lunge, Milz, Leber, Auge, Plazenta, Gehirn, Haut oder Zellen des Knochenmarks infizieren. Infizierte Menschen scheiden das Virus während der akuten Phase in Körperflüssigkeiten wie Speichel, Urin, Samenflüssigkeit, Muttermilch und Tränen aus. Bei immunsupprimierten Patienten kann eine akute Infektion mit CMV fatal verlaufen. Bei Transplantationspatienten kann es hierbei zu einer tödlich verlaufenden CMV-Pneumonie kommen (Meyers et al., 1986). Bei einer akuten Infektion während der Schwangerschaft kann es zu einer kongenitalen Infektion des Fötus mit CMV kommen. Dies führt im Neugeborenen zur sogenannten Einschlusskörperchen-Krankheit (engl.: *cytomegalic inclusion disease*, CID). Als Symptome sind petechiale Hämorrhagien auf der Haut und eine Hepatosplenomegalie klar zu erkennen. Häufig treten lebensgefährliche Verläufe mit Pneumonie, Hepatitis mit einhergehender Gelbsucht, Retinitis, Enteritis-Colitis oder Mikrocephalie auf. Bei milderer Krankheitsverläufen leiden Überlebende oft ein Leben lang an neurologischen Störungen, wie mentale Retardierung, Taub- oder Blindheit (Reddehase, 2002). In den 1990er Jahren wurden die jährlichen Kosten der kongenitalen CMV Infektion in den USA auf ca. 1.9 Milliarden US-Dollar und mindestens 300.000 US-Dollar pro behandeltem Kind geschätzt (Arvin et al., 2004). Die hohen Kosten und Folgeschäden bei Neugeborenen, sowie die Gefahr einer akuten Infektion in immunsupprimierten Patienten machen CMV zu einem unterschätzten Gesundheitsrisiko (Reddehase, 2002).

Nach der akuten Infektion kommt es zu einer Latenz des Virus in verschiedenen Zellen des Organismus. Als Reservoir für latente CMV-Genome sind im Menschen Zellen des Knochenmarks, des peripheren Blutes, sowie Endothelzellen nachgewiesen worden. Innerhalb des Knochenmarks konnten hämatopoetische CD34+-Vorläuferzellen und Monozyten-/DC-Vorläuferzellen als Ausgangsorte neuer replizierender Viruspartikel gezeigt werden (Minton et al., 1994; von Laer et al., 1995; Mendelson et al., 1996; Movassagh et al., 1996; Hahn et al., 1998).

Bei der Therapie einer akuten hCMV-Infektion werden häufig Virusstatika wie Ganciclovir oder Valganciclovir eingesetzt. Dabei handelt es sich um CMV- bzw. Herpesvirus-spezifische Nukleotid-Analoga, die in der Zelle durch die virale Kinase phosphoryliert werden (Tyms et al., 1984). Das dabei entstehende Ganciclovir-Triphosphat wird anschließend in die virale DNA eingebaut und führt zum Abbruch bzw. zur Verlangsamung der Elongation. Ein weiteres antivirales Medikament ist Foscarnet (Aschan et al., 1992). Im Gegensatz zu Ganciclovir benötigt Foscarnet keine Aktivierung durch Kinasen. Während die Therapie mit Ganciclovir durch das Auftreten resistenter Viren und der dosisabhängigen Induktion der Myelosuppression beschränkt wird, ist der Einsatz von Foscarnet durch seine Nephrotoxizität limitiert (Bowden et al., 1987; Goodrich et al., 1991; Alain et al., 1997; Bowen et al., 1998; Bregante et al., 2000). Falls eine Therapie mit Ganciclovir und Foscarnet fehlschlägt, besteht

die Möglichkeit als sogenanntes „second-line“-Therapeutikum Cidofovir einzusetzen (Ljungman et al., 2001). Hierbei handelt es sich ebenfalls um ein Nukleotid-Analogon.

Den effektivsten Schutz gegen virale Infektionen bieten prophylaktische Schutzimpfungen. Obwohl seit Jahrzehnten nach CMV-Vakzinen gesucht wird, konnte bis heute kein effektiver Impfstoff entwickelt werden. Allerdings stehen die Ergebnisse einiger Vakzin-Kandidaten noch aus und weitere Ansätze werden erforscht (Schleiss, 2008). Es ist daher von großer Bedeutung, die Biologie und die Interaktionen von CMV mit dem Immunsystem im Detail zu verstehen. Für eine detaillierte Grundlagenforschung ist der Einsatz moderner Tiermodelle essentiell.

1.4.2 Murines Cytomegalievirus

Da Herpesviren eine hohe Wirtsspezifität besitzen ist die Untersuchung der Infektion des humanen Cytomegalievirus (hCMV) im Tiermodell nicht möglich. Allerdings weist die Infektion der Maus mit dem murinen CMV (mCMV) eine hohe Ähnlichkeit im Infektionsverlauf und dem Krankheitsbild zur hCMV-Infektion auf. Auch in der Maus kommt es wie beim Menschen zur Ausbildung einer Latenz, weshalb die Infektion der Maus mit mCMV heute das am weitesten verbreitete und am besten erforschte Tiermodell für CMV-Infektionen darstellt. In der akuten mCMV-Infektion kommt es zu einer Erkennung des Virus über Rezeptoren der Toll-ähnlichen Rezeptorfamilie (engl. *toll-like receptor*, TLR). TLR3 und TLR9, die hauptsächlich von Dendritischen Zellen exprimiert werden, erkennen virale PAMPs. Die Bindung führt zur Aktivierung des NF- κ B Signalweges, der die angeborene und adaptive Immunantwort anstößt, indem er die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und kostimulatorischen Molekülen induziert (Krug et al., 2004; Tabeta et al., 2004).

Durch die Sekretion von IL-12 und Typ I Interferonen aktivieren mCMV-infizierte DCs NK-Zellen. Diese produzieren daraufhin IFN γ und entfalten zytotoxische Wirkungen über die Expression von GzmB und Perforin (Biron et al., 1999; Delale et al., 2005). Es kommt allerdings nicht in allen Mausstämmen zu einer starken NK-Zellantwort. Dies ist im genetischen Hintergrund der Mausstämmen begründet. C57BL/6 Mäuse exprimieren den aktivierenden NK-Zellrezeptor Ly49H auf ihrer Oberfläche. Ly49H bindet an das Genprodukt des mCMV-ORFs m157, ein dem MHC-I strukturähnlichem Protein, und aktiviert so die NK-Zellantwort (Smith et al., 2002). Balb/c Mäusen hingegen fehlt dieser Rezeptor und sie sind so nicht in der Lage eine effektive NK-Zellantwort auszubilden. Sie werden daher als mCMV-empfindlich und C57BL/6 Mäuse als mCMV-resistent bezeichnet (Scalzo, 2002). Es war zunächst ein Rätsel, weshalb mCMV in seinem Genom das *m157*-Gen behalten hat, obwohl es einen offensichtlichen Nachteil in C57BL/6 Mäusen mit sich bringt. Arase et al. konnten jedoch 2002 im 129/J Mausstamm zeigen, dass das Genprodukt von *m157* an den

inhibitorischen NK-Zellrezeptor Ly49I bindet. Es wurde somit postuliert dass m157 ursprünglich als Evasionsprotein entstanden ist (Arase et al., 2002).

Während in manchen Mausstämmen NK-Zellen die Virusausbreitung während der Anfangsphase der Infektion eindämmen, sind später CD8⁺ T-Zellen für die Bekämpfung des Virus wichtig. Sie führen zur Beendigung der primären Infektion und halten die latente Phase des Virus aufrecht (Reddehase, 2002). Es kommt zu einer starken klonalen Expansion an Virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, deren Anzahl kurze Zeit später wieder zurückgeht. Am Ende entsteht eine Population an CD8⁺ Gedächtniszellen. Eine Besonderheit während der mCMV-Infektion ist die Entstehung sogenannten inflationären (engl.: *inflationary*) CD8⁺ T-Zellpopulationen. Es konnte gezeigt werden, dass ein Jahr nach Infektion Virusepitop-spezifische CD8⁺ T-Zellen bis zu 20 % aller CD8⁺ T-Zellen ausmachen können (Karrer et al., 2003). 2008 konnten Snyder et al. nachweisen, dass diese inflationären mCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen aus kurzlebigen funktionellen T-Zellen bestehen, die aus einer Population von CD8⁺ T-Zellen gespeist werden, die früh während der Infektion entstanden sind (Snyder et al., 2008).

Neben ihrer wichtigen Funktion zu Beginn einer mCMV-Infektion ist für NK-Zellen auch ein regulatorischer Einfluss auf die CD8⁺ T-Zellantwort nachgewiesen worden. Die Abwesenheit von NK-Zellen führt in infizierten Mäusen zu einer verstärkten CD8⁺ T-Zellantwort mit erhöhter IFN γ -Produktion, proliferativer Aktivität und Zellerexpansion (Su et al., 2001). Die Aktivierung von NK-Zellen über den Ly49H-Rezeptor beeinflusst die Frequenz und die Dauer der Infektion in DCs. Dadurch kommt es zu einer verringerten Ausbildung einer langanhaltenden Virus-spezifischen T-Zellantwort (Andrews et al., 2010).

Neben den T-Zellen haben auch B-Zellen eine wichtige Funktion bei der Bekämpfung viraler Infektion. Durch die Produktion spezifischer Antikörper sind sie in der Lage, besonders stark Re-Infektionen mit demselben Virus direkt, ohne die Auslösung einer inflammatorischen Immunantwort, zu bekämpfen. Jonjic und Kollegen konnten bei Untersuchungen der B-Zellantwort während einer mCMV-Infektion zeigen, dass weder B-Zellen noch Antikörper für die Bekämpfung einer Primärinfektion essentiell sind. In weiteren Experimenten infizierten sie B-Zelldefiziente μ MT Mäuse. Sie konnten in diesen Mäusen bei der Reaktivierung von mCMV weit höhere Virustiter im Vergleich zu Kontrollmäusen nachweisen, was den Einfluss von B-Zellen während einer Sekundärinfektion zeigt (Jonjic et al., 1994). Zusätzlich konnten in Transferexperimenten die protektiven Eigenschaften der Antikörper nachgewiesen werden. So konnte die Übertragung von Serum aus infizierten WT-Mäusen auf naive WT- oder μ MT Mäusen die Viruslast während einer Primärinfektion verringern (Reddehase et al., 1994).

1.4.3 Immunevasionsstrategien von mCMV

Cytomegalieviren sind in der Lage in einem Status der Latenz im Wirtsorganismus zu überdauern. Im Mausmodell sind mehrere solcher Immunevasions-Mechanismen beschrieben worden. Vielen dieser Mechanismen liegen Virus-kodierte Proteine zugrunde, die in der Folge als Immunoevasine (Reddehase, 2002), VIPRs (engl.: *viral proteins interfering with antigen presentation*) (Yewdell und Hill, 2002) oder vRAPs (engl.: *viral regulators of antigen presentation*) (Holtappels et al., 2006) bezeichnet werden. Das erste beschriebene Immunoevasin wurde im ORF (engl.: *open reading frame*) m152 des mCMV-Genoms entdeckt. m152 kodiert für das Protein gp37/40. Es hält neu synthetisierte MHC-Klasse I Moleküle im sogenannten ERGIC (engl.: *ER Golgi intermediate compartment*) zurück und führt zu ihrer Akkumulation. Untersuchungen zeigen, dass gp37/40 nur transient an MHC-I bindet und zu einer Modifikation in diesem führt, welches die Interaktion mit Kargo-Komplexen behindert (del Val et al., 1992; Thale et al., 1995; Ziegler et al., 1997; Ziegler et al., 2000). Versuche mit einem $\Delta m152$ -mCMV Stamm hatten eine Attenuation der Virusausbreitung in infizierten Mäusen zur Folge, was die biologische Bedeutung des Immunoevasins zeigt (Krmpotic et al., 1999). Im Balb/c-Mausstamm konnte zusätzlich ein Eingriff in die Kontrolle des angeborenen Immunsystems durch m152 beobachtet werden. So reguliert m152 den hoch-affinen Liganden H-60 des aktivierenden NK-Zell-Rezeptors NKG2D herunter, was zu einer verminderten NK-Zell Antwort gegen mCMV-infizierte Zellen führte (Krmpotic et al., 2002). Weitere Immunoevasine, die MHC-I als Ziel haben, sind in den ORFs m04 und m06 gefunden worden. m06 bindet an antigenbeladene MHC Klasse I Moleküle im Lumen des ER und leitet sie der Degradation in endosomalen/ lysosomalen Kompartimenten um (Reusch et al., 1999). Während m152 und m06 die Verminderung an MHC-I an der Zelloberfläche zum Ziel haben, bindet m04 an MHC-I im ER und eskortiert es zur Zelloberfläche. Der Komplex scheint nicht von CD8⁺ T-Zellen erkannt zu werden. Es ist unklar, ob dies an einer fehlenden Peptidbeladung des MHC-I liegt, oder ob m04 die Erkennung durch CD8⁺ T-Zellen verhindert (Kavanagh et al., 2001). Auch für m04 konnte eine Verbindung zur Kontrolle der angeborenen Immunantwort gezeigt werden. So konnten Kielczewska et al. nachweisen, dass NK-Zellen über den aktivierenden Rezeptor Ly49P die MHC-I Variante H2-D^k zusammen mit m04 erkennen, und Mäuse so resistenter gegen mCMV sind (Kielczewska et al., 2009). In weiteren Experimenten konnte die Gruppe zusätzlich zeigen, dass der inhibitorische Rezeptor Ly49A mit MHC-I interagieren kann und so die Zelle vor NK-Zell Antwort wiederum geschützt wird. Es konnte damit zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Erkennung des „nicht-selbst“ (engl.: *missing-self*) durch NK-Zellen wichtig für die Erkennung und die Kontrolle von viralen Pathogenen *in vivo* ist (Babic et al., 2010). Die Inaktivierung der bekannten mCMV-VIPRs m04, m06 und m152 führte in einer Studie von Lu et al. zu einer zehnfachen Verringerung der Viruslast in den Speicheldrüsen infizierter Mäuse. Weiter konnte nachgewiesen werden, dass dieser Effekt auf eine erhöhte

CD8⁺ T-Zellantwort in diesem Organ zurückzuführen ist (Lu et al., 2006). Immuno-evasine konnten auch im hCMV-Genom nachgewiesen werden. Auch sie haben zum Ziel die MHC-I Expression zu unterdrücken, um die CD8⁺ T-Zellantwort zu verhindern. Besonders hervorzuheben sind hier die Evasine der ORFs US3 und US2, da sie beide Arme der T-Zellantwort behindern. US2 bewirkt wie US3 die Degradation von MHC-I, aber auch den Abbau von MHC-II Molekülen. US3 hingegen bindet an neu-synthetisierte MHC-II Moleküle und führt zu deren Misslokation innerhalb der Zelle (Johnson und Hegde, 2002).

Ein weiterer Immunevasions-Mechanismus scheint für das Virus die Induktion des immunsuppressiven Zytokins IL-10 darzustellen. Diese Vermutung wird dadurch bestärkt, dass im humanen Cytomegalievirus- (hCMV) und im Epstein-Barr-Virus-(EBV) Genom homologe IL-10 Gene nachgewiesen wurden (Moore et al., 1990; Kopenko et al., 2000).

Interleukin-10 (IL-10) wurde 1989 als ein von T_H2-Zellen sekretiertes Molekül entdeckt. Es wurde zunächst als *Cytokine synthesis inhibitory factor* (CSIF) bezeichnet, da es die Bildung pro-inflammatorischer Zytokine in vielen Immunzellen unterdrückt (Fiorentino et al., 1989; Moore et al., 2001). In den folgenden Jahren ist eine Expression von IL-10 in vielen verschiedenen Zell-Populationen nachgewiesen worden. So sezernieren primär Tregs und DCs große Mengen an IL-10, aber auch Makrophagen, T_H1-, T_H3-, T_R1-Zellen, B-Zellen und CD8⁺ T-Zellen sind in der Lage IL-10 zu produzieren (Moore et al., 2001; Kamanaka et al., 2006). IL-10 wirkt auf viele Zelltypen des Immunsystems. So vermindert IL-10 die Expression von Zytokinen wie IFN γ , IL-4 und IL-5 von T-Zellen (Grunig et al., 1997). APCs hingegen reagieren mit einer Verminderung der Expression ihrer kostimulatorischen B7-Moleküle und MHC-II auf ihrer Oberfläche in Gegenwart von IL-10 (Redpath et al., 1999; Moore et al., 2001; Gabrysova et al., 2009). Auch DCs sekretieren IL-10 und ein autokriner Mechanismus vermindert deren Reifung und Einwanderung in den Lymphknoten (Demangel et al., 2002). Bereits 1992 konnte gezeigt werden, dass IL-10 Makrophagen daran hindert, Parasiten über die Freisetzung von NO-Radikalen zu eliminieren (Gazzinelli et al., 1992). Eine Depletion von IL-10 führt in vielen Infektionskrankheiten zu einer unkontrollierten T_H1-Antwort und zu Immunpathologien (zusammengefasst in Ng et al., 2013).

Oakley et al. konnten 2008 während der mCMV-Infektion eine Erhöhung der IL-10 Serumkonzentrationen in den ersten Tagen nachweisen. Die Infektion von IL-10 KO (engl.: *knock-out*)-Mäusen mit mCMV führte zu einem stärkeren Krankheitsverlauf in diesen Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen. Darüber hinaus zeigten die IL-10 KO-Mäuse geringere Viruslasten in der Milz, die durch die Gabe eines depletierenden Antikörpers gegen IFN γ wieder auf das Maß der WT-Kontrollen erhöht werden konnte (Oakley et al., 2008). Auch in anderen Organen konnte ein Einfluss von IL-10 auf den Verlauf der mCMV-Infektion gezeigt werden. So ist in der Leber eine verstärkte Pathologie in IL-10 KO-Mäusen nachgewiesen worden. Allerdings scheint die Depletion von IL-10 in diesem Organ keinen Einfluss auf die

Viruslast zu haben (Tang-Feldman et al., 2011; Gaddi et al., 2012). In weiteren Studien konnte zusätzlich ein Einfluss von IL-10 auf die Gedächtnis T-Zellpopulation gezeigt werden. Bei einer Blockade des IL-10 Rezeptors in chronisch infizierten WT-Mäusen konnte eine verstärkte Gedächtnis T-Zellantwort gemessen werden (Jones et al., 2010). Untersuchungen von Cheeran et al. zu mCMV-Infektionen im Gehirn zeigten in IL-10 KO-Mäusen geringere Mengen an infiltrierenden CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen (Cheeran et al., 2009). Mutnal et al. konnten hingegen einen erhöhten Anteil an einwandernden Neutrophilen-Zellen in das Gehirn von IL-10 KO-Mäusen nachweisen, was zu einer verstärkten Infektion und einer erhöhten Sterblichkeit führte (Mutnal et al., 2010).

Zusammengefasst zeigen die oben beschriebenen Studien einen starken Einfluss des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 auf den Verlauf von mCMV-Infektionen. Dabei werden in verschiedenen Organen viele verschiedene Zellen des Immunsystems beeinflusst. Während es in der Leber zu einer verstärkten Pathologie kommt, aber kein Unterschied in der Viruslast in IL-10 KO-Mäusen verglichen mit WT-Mäusen beobachtet wurde, ist in den Speicheldrüsen eine verringerte Viruslast nachweisbar. Einige Untersuchungen zeigen ein großes Spektrum an IL-10 produzierenden Zelltypen und in den Speicheldrüsen konnte ein Einfluss von IL-10-produzierenden CD4⁺ T-Zellen gezeigt werden (Humphreys et al., 2007; Stacey et al., 2011; Jeitziner et al., 2013). In den übrigen infizierten Organen sind bisher keine solchen Studien durchgeführt worden und die Quelle und der Einfluss von IL-10 bleiben hier weiter umstritten.

1.4.4 Regulatorische T-Zellen während Cytomegalieviren-Infektionen

Wie bereits beschrieben können regulatorische T-Zellen einen Einfluss auf die Immunantwort von Infektionen haben (Abel et al., 2012; Dietze et al., 2013). Besonders die Ausbildung von chronischen Infektionen ist bei manchen Pathogenen stark von der Induktion von Tregs abhängig (Belkaid et al., 2002).

Im Rahmen von CMV Infektionen ist die Rolle von Tregs *in vivo* allerdings bislang nicht hinreichend geklärt. *In vitro* Experimente konnten zeigen, dass die Depletion von CD4⁺ CD25⁺ Tregs aus PBMCs (engl.: *peripheral mononuclear cells*, PBMC) zu einer verstärkten CMV-spezifischen Immunreaktion in CMV-seropositiven Patienten führte (Aandahl et al., 2004) und Untersuchungen mit mCMV-infiltrierten MEFs (Maus embryonale Fibroblasten) deuten auf einen suppressiven Effekt von Tregs *in vitro* hin (Li et al., 2010). In Nierentransplantations-Patienten mit einer rezidiven hCMV-Infektion konnten CMV-antigen-spezifische regulatorische T-Zellen nachgewiesen werden, die *in vitro* suppressive Eigenschaften besaßen (Schwele et al., 2012). Und vor kurzem postulierten Sungur et al., dass Tregs während der mCMV Infektion die Lizenzierung von NK-Zellen unterdrücken können (Sungur et al., 2013).

Somit deuten einige wenige Studien darauf hin, dass Tregs wie bei anderen chronischen Infektionskrankheiten auch bei CMV-Infektionen eine wichtige Rolle spielen. Während verschiedene *in vitro* Untersuchungen einen Effekt von Tregs auf T-Zellantworten vermuten lassen, ist dies bisher *in vivo* insbesondere im Mausmodell noch nicht nachgewiesen worden.

1.5 Zielsetzung

Bei der Aufrechterhaltung der Balance zwischen der effektiven Bekämpfung von Infektionen und der Toleranz gegenüber Selbstantigenen spielen regulatorische T-Zellen (Tregs) eine zentrale Rolle. Eine Störung der Aktivitäten von Tregs kann zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose oder Diabetes Typ-1 führen. Darüber hinaus ist in den letzten Jahren ein Einfluss von Tregs auf die Ausbildung verschiedener chronischer Infektionskrankheiten gezeigt worden.

Chronische Cytomegalieviren-Infektionen stellen ein schwerwiegendes klinisches Problem dar. So kann es bei immunsupprimierten Patienten zu einer Reaktivierung von latenten CMV-Viren kommen, was zu einem schweren Krankheitsverlauf führt.

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von Tregs auf den Verlauf von CMV-Infektionen zu untersuchen. Dazu wird das murine CMV (mCMV) als Modell genutzt. Zunächst soll der Verlauf der Immunantwort in der akuten Infektion besonders im Hinblick auf die Anzahl und den Phänotyp von Tregs untersucht werden. Im weiteren Verlauf soll der Einfluss der Tregs auf die akute mCMV-Infektion *in vivo*, durch die Depletion der Tregs mit Hilfe des DEREK-Mausmodells, betrachtet werden. Hierbei sollen besonders der Aktivierungsstatus der T-Zellen und die Auswirkung auf die Viruslast in der Lunge und den Speicheldrüsen überprüft werden.

Das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 hat einen großen Einfluss auf die mCMV-Infektion während der akuten Phase. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es daher zunächst die IL-10 produzierenden Zellen in verschiedenen Organen im Balb/c Mausstamm während der akuten mCMV-Infektion zu identifizieren. Hierbei soll die transgene IL10-GFP Maus genutzt werden. Nachdem die dominante IL-10-produzierende Zellpopulation identifiziert wurde, soll die IL-10 Produktion in dieser spezifisch unterbunden werden. Hierzu stehen verschiedene transgene Mausmodelle für die spezifische Depletion von IL-10 in unterschiedlichen Zelltypen zur Verfügung.

Die Ergebnisse der Untersuchungen könnten neue Einblicke in die Regulation der Immunantwort bei CMV-Infektionen geben. Die Modulation von regulatorischen T-Zellen oder der IL-10 Expression spezifischer Immunzellen könnten effektive Therapieansätze bei der Bekämpfung von CMV-Infektionen darstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Mauslinien

2.1.1 Tierhaltung

Die in den Versuchen verwendeten Tiere wurden in der Tierexperimentellen Einheit des Universitätsklinikums Essen unter spezifisch pathogenfreien (SPF-) Bedingungen in IVC2 (IVC= individuell belüftete Käfige) gehalten und waren bei Inversuchnahme mindestens sechs Wochen alt. Damit mikrobielle Kontaminationen ausgeschlossen werden konnten wurden alle drei Monate Sentinel-Tiere in einem externen Labor einer histologischen, serologischen und parasitologischen Gesundheitsüberprüfung unterzogen.

2.1.2 Balb/c

Balb/c Mäuse wurden über die Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) bezogen.

2.1.3 Foxp3-GFP

In der transgenen Foxp3-GFP Mauslinie wird ein eGFP (engl.: *enhanced green fluorescence protein*) unter der Kontrolle des Foxp3-Promotors exprimiert (Haribhai et al., 2007). Die Linie wurde ursprünglich aus dem Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) bezogen und in der Tierexperimentellen Einheit des Universitätsklinikums Essen homozygot weiterverpaart.

2.1.4 DEREg

In die Mäuse der transgenen DEREg (engl.: *DEpletion of REGulatory T cells*) Mauslinie ist eine Diphtherie-Toxin-GFP Kasette unter der Kontrolle des Foxp3-Promotors insertiert. Durch die Gabe von Diphtherie-Toxin (DT) können so Foxp3⁺ regulatorische T Zellen depletiert werden (Lahl et al., 2007). Die DEREg Mäuse wurden freundlicherweise von Tim Sparwasser (Twincore, Hannover) zur Verfügung gestellt.

2.1.5 IL-10-GFP

Transgene IL-10-GFP Mäuse tragen ein eGFP unter der Kontrolle des IL-10-Promotors (Kamanaka et al., 2006). Da diese Mäuse genetisch auf der C57BL/6 Mauslinie basierten, wurden sie in der Tierexperimentellen Einheit des Universitätsklinikums Essen unter tierärztlicher Aufsicht durch Verpaarung mit Balb/c Mäusen über mehrere Generationen auf

den genetischen Balb/c Hintergrund gekreuzt. Durch genetische Untersuchungen mittels DNA-Sonden wurde die genetische Identität bestätigt. Die Mäuse wurden anschließend weitergezüchtet.

2.1.6 IL10flx x CD4cre

Die doppeltransgenen IL10flx x CD4cre ($IL-10^{flx/flx} \times CD4cre$) Mäuse wurden in der Tierexperimentellen Einrichtung des Universitätsklinikums Essen gezüchtet. Bei dieser Mauslinie wird das „Cre/LoxP-System“ genutzt, um das Interleukin 10 (IL-10) spezifisch in T Zellen zu depletieren. Hierfür wurden transgene CD4cre Mäuse (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Werner Müller, *University of Manchester*, Vereinigtes Königreich), welche die Cre-Rekombinase unter dem CD4-Promotor exprimieren, mit der transgenen IL-10flx Mauslinie verpaart. In IL10flx Mäusen sind der Promotor und das Exon-1 durch zwei LoxP-Stellen flankiert. Die in $CD4^+$ T-Zellen exprimierte Cre-Rekombinase erkennt die in gleicher Richtung orientierten LoxP-Stellen und schneidet diese als kreisförmiges Produkt, mit dem dazwischen liegenden IL-10 Genfragment, aus der DNA der Zellen aus. Somit sind $CD4^+$ T Zellen in dieser Mauslinie nicht mehr in der Lage aktives IL-10 zu produzieren (Roers et al., 2004). Das IL10flx Konstrukt wurde in der Mauslinie homozygot das CD4cre Konstrukt heterozygot weiterverpaart. Somit wurden in einer Generation Mäuse erhalten, die negativ für das CD4cre Konstrukt waren. Diese wurden in den folgenden Versuchen als Wildtyp-(WT-) Kontrollen eingesetzt.

2.1.7 FIC x IL-10flx

Wie bereits bei den IL10flx x CD4cre Mäusen beschrieben, wurde auch bei der doppeltransgenen FIC x IL-10flx Mauslinie das „Cre/ LoxP-System“ genutzt. Bei diesem Modell werden allerdings FIC-(„*Fox-IRES-Cre*“) Mäuse (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Shimon Sakaguchi, *Kyoto University*, Japan) (Wing et al., 2008) mit den IL-10flx Mäusen verpaart. Die FIC Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Foxp3-Promotors wodurch IL-10 in allen Foxp3⁺ regulatorischen T Zellen spezifisch depletiert wird. Die Mäuse wurden in der Tierexperimentellen Einrichtung des Universitätsklinikums Essen gezüchtet. Um in jedem Wurf Wildtyp-Geschwistertiere zu erhalten wurde das FIC-Allel heterozygot vererbt. Somit konnten $FIC^{-/-} \times IL10flx^{+/+}$ (WT-) Geschwistertiere erhalten werden. Diese wurden in den folgenden Versuchen als Wildtyp-(WT-) Kontrollen eingesetzt.

2.1.8 Thy 1.1

Der Thy 1.1 Mausstamm besitzt denselben genetischen Hintergrund wie der Balb/c-Mausstamm. Die T-Zellen besitzen allerdings den spezifischen Marker CD90.1, während T-Zellen aus Balb/c Mäusen CD90.2 (Thy 1.2) tragen. Durch spezifische Antikörper gegen diese Oberflächenmoleküle lassen sich die Zellen in einem Gemisch durchflusszytometrisch voneinander unterscheiden.

2.2 mCMV Smith Stamm

Der hier verwendete mCMV Stamm (ATCC VR-1399) wurde freundlicherweise von Dr. Anke Kraft (Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt.

2.3 Chemikalien

Tab. 2.1: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Carl-Roth, Karlsruhe
Agarose	Biobudget, Krefeld
Ammoniumacetat [C ₂ H ₃ O ₂ NH ₄]	Carl-Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid [NH ₄ Cl]	Carl-Roth, Karlsruhe
Amphotericin B	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Ampli Taq 10x Reaktionspuffer	Applied Biosystems, Darmstadt
AutoMACS Pro Washing Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
AutoMACS Running Buffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Hamburg
Collagenase Typ D	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Diphtherie-Toxin (DT)	Merck, Darmstadt
Diethyldicarbonat-Wasser (DEPC-H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Desoxyribonuclease (DNase) I Typ II	Sigma-Aldrich, USA
Dinatriumhydrogenphosphat [Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O]	Carl Roth, Karlsruhe
dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Fermentas, St.Leon-Rot
Ethanol, absolut	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe

Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Formaldehyd-Lösung	Sigma-Aldrich, USA
HEPES Buffer (1 M)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Gentamycin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe
Go Taq Flexi 5 x Puffer	Promega, Mannheim
Kristallviolett	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogencarbonat $[K_2(HCO_3)_2]$	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat $[KH_2PO_4]$	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid $[KCl]$	Carl Roth, Karlsruhe
Lineares Polyacrylamid (LPA)	Ambion, Darmstadt
Magnesiumchlorid $[MgCl_2]$	Promega, Mannheim
MML V-RT 5x Puffer	Promega, Mannheim
Natriumchlorid $[NaCl]$	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	Sigma, Hamburg
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Trypan Blue Färbelösung (1x)	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin EDTA	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Xylencyanol FF	Sigma, Hamburg

2.4 Kulturmedien, Puffer und Lösungen

2.4.1 Kulturmedien

IMDM-Komplettmedium

„Iscoe's Modified Dulbecco's Medium“
mit GlutaMAX™ -I und 25mM Hepes
(Invitrogen, Karlsruhe)
Supplementiert mit:
10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS
100 U/ ml Penicillin
0,1 mg/ ml Streptomycin
25 µM 2-Mercaptoethanol

RPMI 1640-Komplettmedium	„Roswell Park Memorial Institute“-Medium Mit GlutaMAX™ -I und 25mM Hepes (Invitrogen, Karlsruhe) Supplementiert mit: 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS 100 U/ ml Penicillin 0,1 mg/ ml Streptomycin
DMEM-Komplettmedium	„Dulbecco's Modified Eagle“-Medium (Gibco, Paisley, UK) Supplementiert mit: 10 % (v/ v) hitzeinaktiviertes FCS 100 U Penicillin 0,1 mg/ ml Streptomycin 10 mM Hepes 2 mM L-Glutamin
EMEM-Komplettmedium	„Eagle's Minimum Essential“-Medium (Lonza, Walkersville, USA) Supplementiert mit: 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS 250 U Penicillin 0,25 mg/ ml Streptomycin 5 mM L-Glutamin 250 µg/ l Amphotericin B

2.4.2 Puffer

ACK-Puffer	155 mM NH ₄ Cl 9,98 mM KHCO ₃ 0,5 M EDTA (pH 8,0) pH 7,2 -7,4; sterilfiltrieren
DNA-Ladepuffer (6-fach)	10 mM Tris (pH 7,5) 0,03 % (w/v) Bromphenolblau 0,03 % (w/v) Xyclencyanol FF 60 % (v/v) Glycerin 60 mM EDTA

FACS-Puffer	2 % (v/v) FCS 2 mM EDTA 1 x PBS-Puffer
PBS-Puffer	136 mM NaCl 2,68 mM KCl 8,09 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 1,47 mM KH ₂ PO ₄
TBE-Puffer	89 mM Tris 89 mM Borsäure 2,53 mM EDTA
TE-Puffer (10/1)	10 mM Tris/ HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA
Tail-Puffer	100 mM Tris/ HCl (pH 8,5) 200 mM NaCl 0,2 % (w/v) SDS 5 mM EDTA

2.4.3 Lösungen

Collagenase/ DNase-Lösung	1 mg/ ml Collagenase Typ D 10 µg/ ml DNase I Typ II 1 x IMDM-Medium + 10 % FCS
Trypanblau-Lösung	0,5 g Trypanblau 0,9 g NaCl ad 100 ml H ₂ O

2.5 Primer, DNA-Marker, Enzyme, Antikörper und Peptide

2.5.1 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Invitrogen, Karlsruhe) bezogen. Zur Umschreibung von mRNA zu cDNA wurden Oligo (dT) Primer (0,5 µg/µl) und Random Primer (3,0 µg/µl) benutzt.

Tab. 2.2: Primer

Oligonukleotide	Sequenz	Annealing Temperatur (T _A)
RPS9 5'mm	5'-CTGGACGAGGGCAAGATGAAGC -3'	52 °C -59 °C
RPS9 3'mm	5'-TGACGTTGGCGGATGAGCACA -3'	
IL-10 5'mm	5'-CTGGACAACATACTGCTAACCGACTC -3'	58 °C
IL-10 3'mm	5'-ATTTCTGGGCCATGCTTCTCTGC -3'	

2.5.2 Enzyme und DNA-Marker

Ampli Taq Gold Polymerase	Applied Biosystems, Darmstadt
GoTaq <i>Hot Start Polymerase</i>	Promega, Mannheim
M-MLV <i>Reverse Transcriptase</i>	Promega, Mannheim
RNase H <i>minus point mutant</i>	Promega, Mannheim
Gene Ruler 100 bp <i>ladder Plus</i>	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot

2.5.3 Antikörper

Tab. 2.3: Antikörper

Epitop (Anti-Maus-)	Fluorochrom	Klon	Hersteller
CD3	Ungekoppelt	145-2C11	BD Biosciences, Heidelberg
	PE	145-2C11	BD Biosciences, Heidelberg
	PE-Cy7	145-2C11	BD Biosciences, Heidelberg
CD4	PB	RM4-5	BD Biosciences, Heidelberg
	PerCP	RM4-5	BD Biosciences, Heidelberg
	FITC	GK1.5	BD Biosciences, Heidelberg
	APC	RM4-5	BD Biosciences, Heidelberg

Epitop (Anti-Maus-)	Fluorochrom	Klon	Hersteller
CD8a	APC	53-6.7	BD Biosciences, Heidelberg
	PB	53-6.7	BD Biosciences, Heidelberg
	FITC	53-6.7	BD Biosciences, Heidelberg
	PE	53-6.7	BD Biosciences, Heidelberg
CD62L	PE	MEL-14	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD11c	APC	HL-3	BD Biosciences, Heidelberg
CD335 (NKp-46)	V450	29.A1.4	BD Biosciences, Heidelberg
CD25	PE	PC61	BD Biosciences, Heidelberg
Foxp3	FITC	FJK-16s	eBioscience, Frankfurt a.M.
GzmB	APC	GB12	Invitrogen, Darmstadt
I-A/I-E	FITC	2G9	BD Biosciences, Heidelberg
IFN γ	PE	XMG1.2	BD Biosciences, Heidelberg
Nrp-1	APC	-	R&D Systems, Minneapolis, USA

Tab. 2.4: Fluorochrome

Fluorochrom	Abkürzung	Absorption (nm)	Emission (nm)
Allophycocyanin	APC	633	660
Pacific Blue [®]	PB	405	455
R-Phycoerythrin	PE	488	575
Fluoresceinisothiocyanat	FITC	488	425
Peridinin-chlorophyll protein	PerCP	482	678
PE-Cy [™] 7	PE-Cy7	496	785
AlexaFluor [™] 647	AF-647	650	665
BD Horizon [™] V450	V450	404	448

2.5.4 Peptide

Für die intrazelluläre IFN γ -Färbung (ICS-IFN γ , 2.8.5.3) wurden die mCMV-spezifischen MHC-I restringierten Peptide IE1 (Sequenz: YPHFMPTNL) und m164 (Sequenz: AGPPRYSRI) zur Stimulation verwendet. Die beiden Peptide wurden als Auftragsarbeit von Intavis Bioanalytical Instruments (Köln, Deutschland) synthetisiert und in lyophilisierter Form geliefert. Sie wurden für die Anwendung in PBS mit 10 % DMSO in einer Konzentration von 2 mg/ ml gelöst und bei -20 °C gelagert.

2.5.5 Standardkits

<i>CD4⁺ T Cell Isolation Kit, mouse</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit</i>	Sigma, Hamburg
<i>for General Cell Membrane Labeling</i>	
<i>Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set</i>	eBioscience, Frankfurt a. M.

2.6 Geräte

Tab. 2.5: Geräte

Gerät	Hersteller
AutoMACS (AutoMACS pro)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Brutschrank (HERA cell 150)	Thermo Scientific, Langenselbold
FACS (BD LSR II)	BD Biosciences, Heidelberg
FACS (BD ARIA II)	BD Biosciences, Heidelberg
FastPrep®-24 Homogenisator	MP Biomedicals, Eschwege
GelDoc Station	Intas GmbH, Göttingen
Gellaufkammer	Whatman GmbH, Dassel
Mikroskop (Axiovert 40 C)	Zeiss AG, Jena
PowerSupply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Real-Time PCR-System (7500 Fast Real-Time PCR System)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Sicherheitswerkbank Klasse II (MSC-Advantage)	Thermo Scientific, Langenselbold
Sterilbank (DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M-AR)	Biosan, Riga, Litauen
Thermocycler (T3000 Thermocycler)	Biometra GmbH, Göttingen
Thermoblock (Thermomixer comfort)	Eppendorf AG, Hamburg
Vortexer (MS3 basic)	Ika GmbH & Co. KG, Staufen
Waage (CP2202S)	Sartorius AG, Göttingen
Sicherheitswerkbank Klasse II (Biowizard Golden Liner)	Kojair [®] , Vilppula, Finland
Zentrifuge (MULTIFUGE 3SR+)	Thermo Scientific, Langenselbold
Zentrifuge (Centrifuge 5417R)	Eppendorf AG, Hamburg

Nicht aufgelistete Geräte entsprachen dem üblichen Laborstandard.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Genotypisierung transgener Mauslinien

Um zu gewährleisten, dass die im Versuch verwendeten Mäuse das jeweils funktionale Transgen trugen, wurden Genotypisierungen aus Schwanzbiopsien durchgeführt. Hierzu wurde eine Schwanzbiopsie bei den Mäusen ab einem absatzfähigem Alter (mind. 4 Wochen alt) durchgeführt. Die Schwanzspitzen wurden für mindestens 3 h in 90 µl Tail-Puffer (2.4.2) und 10 µl Proteinase K in einem Thermomixer bei 56 °C schüttelnd verdaut. Nach einer 5 minütigen Hitzeinaktivierung bei 95 °C wurden sie abzentrifugiert (6000 xg, 5 min), der Überstand entnommen und 1: 50 in destilliertem H₂O verdünnt. Hieraus wurde 1 µl für die Genotypisierungs-PCR verwendet. In Tabelle B.6 sind die Typisierungsprimer aufgelistet.

Tab. 2.6: Oligonukleotidprimerpaare zur Genotypisierung transgener Mauslinien

Transgen	Primer	Annealing Temperatur (T _A)
Foxp3-GFP	5'-GCGTAAGCAGGGCAATAGAGG -3' 5'-GCATGAGGTCAAGGGTGATG -3'	58 °C
DEREG 1	5'-GCGAGGGCGATGCCACCTACGGCA -3' 5'-GGGTGTTCTGCTGGTAGTGGTCGG -3'	60 °C
DEREG 2	5'-CCCAGGTTACCATGGAGAGA -3' 5'-GAACTTCAGGGTCAGCTTGC -3'	60 °C
IL-10flx	5'-CCAGCATAGAGAGCTTGCATTACA -3' 5'-GAGTCGGTTAGCAGTATGTTGTCCAG -3'	60 °C
CD4cre	5'-ACGACCAAGTGACAGCAATG -3' 5'-CTCGACCAGTTTAGTTACCC -3'	60 °C
FIC	5'-TGTGTGATAGTGCCCGTGGTTC -3' 5'-TTCGCAAGAAGAGGAGCCAACG -3'	61 °C
FIC wt	5'-CTGCTTCCTTCACGACATTCAAC -3' 5'-AAGTGCTTTGTGCGAGTGGAGAGC -3'	61 °C
IL10-GFP	5'-CCAAAAGACGGCAATATGGT -3' 5'-GTGTGTATTGAGTCTGCTGGAC -3' 5'-GTGTGGCCAGCCTTAGAATAG -3'	63 °C

Reaktionsansatz der Genotypisierungs-PCR:

1 µl genomische DNA (1:50 Verdünnung aus Verdau (2.7.1))
 1-fach Reaktionspuffer (Promega, Mannheim)
 1,5 mM MgCl₂
 1 mM dNTP Mix (Stock: 2,5 mM jedes Nukleotid)
 5 µM Vorwärtsprimer
 5 µM Rückwärtsprimer
 0,5 U GoTaq Hot Start Polymerase
 ad 20 µl H₂O steril

PCR-Programm der Genotypisierungs-PCR:

95°C 10 Minuten	
95°C 30 Sekunden	} 10 Zyklen
T _A 90 Sekunden	
72°C 90 Sekunden	
95°C 15 Sekunden	} 27 Zyklen
T _A 45 Sekunden	
72°C 90 Sekunden	

2.7.2 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese kann die Länge eines DNA-Fragmentes, wie beispielsweise eines PCR-Produktes, bestimmt werden. Dazu wird die negative Ladung der DNA ausgenutzt: Die DNA läuft in einem Agarosegel, welches in ein elektrisches Feld gelegt wird, durch ihre Ladung zur Anode. Das in der Agarosematrix enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in der DNA, die daraufhin unter UV-Licht im Gel sichtbar gemacht werden kann. Durch Einsatz eines DNA-Markers, der DNA-Fragmente bekannter Größe enthält, kann die Größe des aufgetragenen DNA-Fragmentes abgeschätzt werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Agarosegele hatten eine Konzentration von 1 % (w/v) Agarose in TBE-Puffer (2.4.2). Die Agarose wurde durch Aufkochen gelöst, mit 0,5 µg/ ml Ethidiumbromid versetzt und zur Abkühlung in eine Gelkammer gefüllt. Die Proben wurden mit 6 x Ladepuffer (2.4.2) versetzt und in die Taschen des Agarosegels gegeben. Als Laufpuffer wurde TBE-Puffer genutzt und als Längenstandard ein 100 bp Standard-DNA-Marker (2.5.2) eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte in einem elektrischen Feld mit einer Spannung von 100-150 V. Nach der Auftrennung wurde die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert.

2.7.3 Isolierung von Gesamt-RNA

Für Genexpressionsanalysen verschiedener Zellpopulationen, mittels Quantitativer Real-Time PCR (2.7.5), wurde zuvor Gesamt-RNA isoliert. Hierzu wurde das RNeasyMiniKit® (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben benutzt. Die erhaltene Gesamt-RNA wurde in 100 µl DEPC-H₂O gelöst und durch Zugabe von 1 µl linearem Polyacrylamid (5 mg/ ml), 0,5 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumen eiskalten, reinen Ethanol für mindestens 1 h bei -80 °C gefällt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (20800 xg, 30 min, 4 °C)

und mehrfach mit 80 %igem Ethanol gewaschen. Die Pellets wurden luftgetrocknet und in adäquaten Volumen DEPC-H₂O aufgenommen.

2.7.4 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Nach der Isolation der Gesamt-RNA (2.7.3) musste sie für die folgende Genexpressionsanalyse (2.7.5) in cDNA (engl.: *contemplatory* DNA) umgeschrieben werden. Dies erfolgte durch die Reverse Transkription. Dazu wurde die RNA mit einem Primer-Mix aus Random Hexamer-und Oligo(dT)-Primern versetzt und im Thermocycler für 10 min bei 70 °C erhitzt, damit sich die Primer an die RNA anlagern können.

Standardansatz für die Primerhybridisierung:

1 µg RNA
1,5 µg Random Hexamer-Primer
0,25 µg Oligo (dT)-Primer
ad 14 µl H₂O

Die cDNA-Synthese erfolgte nach Zugabe der Reversen Transkriptase im Thermocycler bei 42 °C für 60 min.

Zusatz zur Initialisierung der cDNA-Synthese:

4 µl (1 x) 5 x M-MLV-Reverse Transkriptase-Puffer
1 µl (2,5 mM) 10 mM dNTP-Mix
1 µl (200 U) M-MLV Reverse Transkriptase

Um eine unerwünschte Enzymreaktion zu unterbinden, wurde die Reaktion nach 60 min durch eine Inkubation für 5 min bei 90 °C beendet. Die Proben wurden anschließend bei -20 °C gelagert.

2.7.5 Quantitative Real-Time PCR

Für die Genexpressionsanalyse von IL-10 wurde Gesamt-RNA aus CD4⁺Foxp3⁺ und CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen isoliert (2.7.3). Die Zellen wurden zuvor mit dem FACS-ARIA II (BD, Heidelberg) aus Foxp3-GFP Mäusen 7 Tage nach mCMV Infektion oder aus naiven Mäusen sortiert (2.8.4). Die RNA wurde durch eine Reverse Transkription in cDNA übersetzt (2.7.4) und konnte so für die Quantitative Real-Time PCR eingesetzt werden. Die Proben wurden mit dem SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, Schwerte), der AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase, dNTPs und die benötigten Pufferkomponenten enthält, und entsprechenden Primern versetzt. SYBR Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff der in DNA-

Fragmente interkaliert und so bei steigender Anzahl der Fragmente zu einem entsprechend stärkeren Fluoreszenzsignal in der Probe führt.

Ansatz: ~ 20 ng cDNA
 10 µl (1-fach) 10-fach Power SYBR Green PCR Master Mix
 50 – 900 mM Vorwärtsprimer
 50 – 900 mM Rückwärtsprimer
 ad 20 µl H₂O steril

Für die Quantifizierung wurde die gleiche Menge an cDNA aller Proben zu einer Probe vereint. Hieraus wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, um eine Eichkurve zu ermitteln. Anhand der Eichkurve konnten anhand der gemessenen CT (engl.: *cycle threshold*, Fluoreszenzschwellen)-Werte die relativen Template-Konzentrationen gemessen werden. Als Bezugsgröße für die Quantifizierung wurde zeitgleich das *housekeeping* Gen *rps9* (ribosomales Protein 9) gemessen und die hier gemessenen Werte zur Normalisierung genutzt. *rps9* wird in allen Zelltypen unabhängig vom Aktivierungsstatus konstitutiv exprimiert. Für die Aufzeichnung der Fluoreszenzsignale am Ende eines Amplifikationszyklus wurde das 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) genutzt. Die Auswertung erfolgte mit der 7500 Fast System Software (Applied Biosystems).

Programm der quantitativen Real-Time PCR:

95°C 10 Minuten	
95°C 15 Sekunden	} 40 Zyklen
58°C 1 Minute	
72°C 1 Minute	
95°C 15 Sekunden	
60°C + 1 Minute (Schmelzkurve)	
95°C 15 Sekunden	

Primer: siehe Tabelle 2.2

2.8 Zellbiologische Methoden

2.8.1 Isolation von Einzelzellsuspensionen aus der Milz

Nach Euthanasie wurden Mäusen die Milzen entfernt. Die Lymphozyten wurden mit ACK-Puffer mit Hilfe einer Spritze mit 26G ½'' Kanüle und einer Pinzette aus der Milz herausgespült. Anschließend wurde die Lösung mit FACS-Puffer verdünnt und abzentrifugiert (300 xg, 10 min, 4 °C). Die Zellen wurden je nach Anwendung in FACS-Puffer oder IMDMcomplete Medium aufgenommen.

2.8.2 Isolation von Lymphozyten aus der Lunge und den Speicheldrüsen

Mäuse wurden mittels CO₂-Inhalation euthanasiert. Die Organe wurden mit PBS-Puffer perfundiert, um Lymphozyten und Blutrückstände aus den Gefäßen zu entfernen. Die Organe wurden halbiert und eine Hälfte für die Bestimmung der Viruslast mittels Plaque-Assay vorbereitet (2.8.12). Anschließend wurde die andere Hälfte in einer Petrischale mit einer Schere zerkleinert und in 6 ml Collagenase-Verdauungslösung in ein 15 ml Röhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden für 45 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Alle 5 min wurden die Suspensionen intensiv gemischt. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Organsuspensionen durch ein 100 µm Sieb gegeben und das Sieb mit 5 ml PBS gespült. Nach einem Zentrifugationsschritt (300 xg, 10 min, 4 °C) wurden die Pellets zum Lysieren von noch vorhandenen Erythrozyten in 1 ml ACK-Puffer resuspendiert und 1 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 5 ml FACS-Puffer aufgefüllt und die Zellen abzentrifugiert (300 xg, 10 min, 4 °C). Die Zellen wurden in FACS-Puffer aufgenommen und auf Eis gelagert.

2.8.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension wurde ein Aliquot mit einer angemessenen Menge Trypanblau-Lösung (2.4.3) versetzt und unter dem Lichtmikroskop analysiert. Trypanblau ist ein Aviditätsfarbstoff, welcher durch die perforierte Zellmembran toter Zellen diffundiert und diese blau färbt. Lebende Zellen mit intakter Zellmembran bleiben ungefärbt und können so von toten Zellen unterschieden werden. Zur Auszählung wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Die Anzahl lebender Zellen pro Großquadrat wird mit dem Verdünnungsfaktor und dem Faktor 10⁴ (Volumenfaktor für 1 mm³) multipliziert. Hieraus ergibt sich die Zellzahl pro Milliliter Suspension. Um die Gesamtzellzahl zu erhalten, muss dieser Wert noch mit dem Suspensionsvolumen multipliziert werden.

2.8.4 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um eine Methode Zellen in einer Suspension zu quantifizieren und zu charakterisieren. Dazu werden die Zellen in einem laminaren Strom in einer sogenannten Flusszelle an Lasern vorbeigeführt. Das Laserlicht wird gebrochen oder gestreut, von Detektoren aufgenommen und in elektrische Signale umgewandelt. Dabei wird die Lichtmenge, die mit einem Winkel von 3-10 ° gestreut wird als Vorwärtsstreulicht (engl.: *forward scatter*, FSC) bezeichnet und ist proportional zur Größe der Zelle. Licht welches in einem Winkel von 90 ° abgestrahlt wird, wird als Seitwärtsstreulicht (engl.: *sideward scatter*, SSC) bezeichnet und ist abhängig von der Granularität und Membranfaltung der Zellen. Zusätzlich können Fluorophor-gekoppelte Antikörper eingesetzt werden, um spezifische Moleküle von Zellen zu markieren. Die Fluorochrome werden von Lasern spezifischer Wellenlänge angeregt und das abgegebene Emissionslicht mit spezifischen Detektoren aufgenommen. So können Zellen als Punkte anhand ihrer Größe, Granularität und mit Antikörpern markierten Molekülen charakterisiert und in einem Diagramm dargestellt werden. Für die durchflusszytometrische Analyse wurde in dieser Arbeit das FACS LSR-II (BD, Heidelberg) und zur Auswertung die DIVA-Software (BD Bioscience, Heidelberg) verwendet. Durch Einsatz des Zellsorters FACS-ARIA II (BD, Heidelberg) wurden die Zellen nach ihren Eigenschaften isoliert.

2.8.5 Antikörperfärbung für die durchflusszytometrische Messung

2.8.5.1 Oberflächenfärbung

Es wurden jeweils mindestens 5×10^5 Zellen pro Kavität in einer 96-well Rundbodenplatte ausgelegt und abzentrifugiert (300 xg, 5 min, 4 °C). Anschließend wurden die Zellen in der spezifischen Antikörperlösung in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei 4 °C im Dunkeln. Anschließend wurden pro Kavität 100 µl FACS-Puffer hinzugegeben, um die nicht gebundenen Antikörper zu verdünnen. Die Zelllösung wurde erneut abzentrifugiert (300 xg, 5 min, 4 °C) und in 200 µl FACS-Puffer für die folgende durchflusszytometrische Analyse aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt.

2.8.5.2 Intrazelluläre Färbung

Für die Färbung intrazellulärer Moleküle zur durchflusszytometrischen Analyse wurde das *Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set* Kit von eBioscience (Frankfurt a. M.) genutzt. Falls zusätzlich zur intrazellulären Färbung Oberflächenmoleküle gefärbt werden sollten, so musste dies zuerst erfolgen. Nachdem die Zellen wie unter 2.8.5.1 gefärbt wurden, wurden die ungebundenen Antikörper mit PBS-Puffer verdünnt. Nach einer

Zentrifugation (300 xg, 5 min, 4 °C) wurden die Zellen in 100 µl Fix/Perm-Lösung (eBioscience, Frankfurt a. M.) resuspendiert und für 1,5 h bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Saponin in der Fix/Perm-Lösung bildet Poren in der Zellmembran, wodurch Antikörper in die Zelle eindringen können, die Zelle allerdings auch abstirbt. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert, in 100 µl Antikörperlösung in PermPuffer (eBioscience, Frankfurt a. M.) aufgenommen und für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurde die Antikörperlösung mit PermPuffer verdünnt und erneut abzentrifugiert (300 xg 5 min, 4 °C) und die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen.

2.8.5.3 Intrazelluläre Zytokin-Färbung

Um von Zellen sezernierte Zytokine wie IFN γ intrazellulär optimal färben zu können, können die Zellen stimuliert werden. IFN γ wird durch die Zugabe von Brefeldin A in der Zelle angereichert, da ansonsten bei der Färbung für die durchflusszytometrischen Analyse zu wenig IFN γ vorläge und das Fluoreszenzsignal zu schwach wäre. Brefeldin A dringt in die Zellen ein und verhindert die Abschnürung von Vesikeln aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER). Da IFN γ im ER synthetisiert wird, wird so eine Anreicherung des Zytokins in der Zelle erreicht. Die Zellen wurden nach der Isolation (2.8.1, 2.8.2) in vierfacher Ausfertigung in einer 96-well Rundbodenplatte ausgelegt und bei 300 xg, 5 min, 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurden sie in 100 µl RPMI-Medium versetzt mit 0,1 U/ ml IL-2 und 10 µg/ ml Brefeldin A aufgenommen. Das IL-2 ist wichtig für das Überleben der Zellen. Um die Grundexpression ohne Restimulation zu ermitteln, wurde als erster der vier Ansätze eine negativ-Kontrolle ohne weitere Zugabe angesetzt. Um alle aktivierten T-Zellen zu stimulieren, wurde im zweiten Ansatz, der positiv-Kontrolle, zusätzlich 0,5 µg/ ml α CD3 hinzugegeben. Zusätzlich sollte in zwei weiteren Ansätzen die IFN γ Expression antigenspezifischer CD8 $^{+}$ T-Zellen untersucht werden. Hierzu wurde je einem Ansatz eines der mCMV-spezifischen MHC-I restringierten Peptide (m164 und IE1, siehe 2.5.4) in einer Konzentration von 10 µg/ ml hinzugefügt. Die Platte wurde für 4,5 h bei 37 °C und 5 % CO $_2$ im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte eine Oberflächenfärbung (2.8.5.1) gefolgt von einer intrazellulären Färbung (2.8.5.2) mit einem spezifischen IFN γ Antikörper. Die Zellen wurden nachfolgend durchflusszytometrisch analysiert.

2.8.6 Generierung von bestrahlten APCs

Es konnte gezeigt werden, dass Tregs stärker in der Anwesenheit von APCs und anti-CD3-Antikörpern (anti-CD3-AK), als mit gekoppelten anti-CD3-AK und löslichem anti-CD28-AK inhibieren (Shevach, 2009). Nach der Euthanasie wurden aus naiven Balb/c Mäusen Lymphozyten aus der Milz isoliert (2.8.1). Die Zellen wurden anschließend in 2 ml IMDM-

Komplettmedium aufgenommen und mit 30 Gray bestrahlt. Die bestrahlten APCs wurden sowohl im *in vitro* Inhibitionstest (2.8.10), als auch im *in vitro* Proliferationstest (2.8.9) zur Stimulation verwendet.

2.8.7 Isolierung von CD4⁺ T-Zellen

Aus einer Einzelzellsuspension von Milzzellen (2.8.1) wurden CD4⁺ T-Zellen mit Hilfe der magnetischen Zellsortierung (engl.: *magnetic activated cell sorting*, MACS) isoliert. Hierzu wurde das murine *CD4⁺ T Cell Isolation Kit* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) nach Herstellerangaben genutzt. Die magnetische Separation erfolgte mit einem AutoMACS Pro (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach).

2.8.8 PKH26-Markierung von Lymphozyten

Durch den Einsatz von Fluoreszenzmarkern ist es möglich, die Proliferation von Zellen durchflusszytometrisch zu verfolgen. Dazu wurde das PKH26 Färbekit (*PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling*, Sigma, Hamburg) eingesetzt. Als lipophiler fluoreszierender Farbstoff lagert sich PKH26 in die Zellmembran ein und wird zu gleichen Teilen bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. Somit kann über die Abnahme des Fluoreszenzsignals die Proliferation durchflusszytometrisch analysiert werden. PKH26 hat Fluoreszenzeigenschaften ähnlich denen von R-Phycoerythrin (PE). Die sortierten CD4⁺ T-Zellen wurden mit IMDM (ohne Zusätze) gewaschen und anschließend in 700 µl Diluent c (Sigma, Hamburg) und 1 µl PKH26 (Sigma, Hamburg) aufgenommen. Nach einer 4 minütigen Inkubation bei RT wurde 1 ml FCS hinzugegeben und eine weitere Minute inkubiert. Die Markierung der Zellen wurde, aufgrund der Lichtempfindlichkeit von PKH26, im Dunkeln durchgeführt. Zuletzt wurden die Ansätze mit 4 ml IMDM-Komplettmedium verdünnt, zentrifugiert (300 xg, 10 min, 4 °C) und in IMDM-Komplettmedium resuspendiert.

2.8.9 *In vitro* Proliferationstest

Um die Proliferationsfähigkeiten von T-Zellen zu analysieren, wurden sortierte CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen aus mCMV-infizierten Foxp3-GFP Mäusen mit PKH26 (2.8.8) markiert. Als Kontrollen wurden Zellen aus nicht infizierten Mäusen verwendet. Nach Fluoreszenzmarkierung wurden jeweils 3 x 10⁵ Zellen zusammen mit 2 x 10⁵ bestrahlten APCs isoliert aus Thy 1.1 Mäusen in insgesamt 200 µl IMDM-Komplettmedium pro Kavität in einer 96-well Flachbodenplatte gegeben. Zur Stimulation wurde 1 µg/ ml αCD3 hinzugegeben und die Platte für 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Als

Kontrolle dienten jeweils nicht stimulierte Ansätze. Die Proliferation wurde über die Abnahme des Fluoreszenzfarbstoffes im Durchflusszytometer gemessen.

2.8.10 *In vitro* Inhibitionstest

Für die Bestimmung der suppressiven Eigenschaften von CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen (Tregs) aus mCMV infizierten Foxp3-GFP Mäusen wurden CD4⁺CD25⁻ (Responder-) T-Zellen aus naiven Thy 1.1 Mäusen sortiert und mit PKH26 (2.8.8) markiert. Jeweils 1 x10⁵ Responder T-Zellen wurden mit 1 x10⁵ oder 5 x10⁴ Tregs, isoliert aus infizierten oder nicht-infizierten Foxp3-GFP Mäusen, in einer Kavität einer 96-well Flachbodenplatte zusammen mit 3 x10⁵ bestrahlten APCs kokultiviert. Tregs inhibieren stärker in der Anwesenheit von APCs, als mit gekoppelten anti-CD3-AK und löslichem anti-CD28-AK (Shevach, 2009). Für die Stimulation der Responder-T-Zellen wurde 1 µg/ ml αCD3 hinzugegeben und die Platte für 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Als Kontrolle dienten Ansätze stimulierter und unstimulierter Responderzellen ohne Tregs.

Nach der Inkubationszeit wurde die Suppressionsfähigkeit der Tregs, gemessen an der Proliferationsstärke der Responderzellen über die Abnahme des Fluoreszenzfarbstoffes, durchflusszytometrisch bestimmt.

2.8.11 Messung von Zytokinen im Blut

Nach Euthanasie wurde Mäusen Blut über eine Herzpunktion entnommen. Das Blutplasma wurde durch eine Zentrifugation für 10 min bei 20800 xg und 4 °C von den übrigen Blutbestandteilen getrennt und bei -80 °C gelagert. Die Quantifizierung des Zytokins IFNγ wurde mit Hilfe des „Procarta Zytokine Assay Kits“ (Panomics, Fremont, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Zytokinkonzentrationen wurden anschließend mit der Luminex IS Software (Luminex Corporation, Austin, USA) bestimmt.

2.8.12 Herstellung von Organsuspensionen

Nach Euthanasie wurden Mäusen die Lunge und Speicheldrüsen entnommen. Diese wurden mit PBS-Puffer perfundiert, um Lymphozyten und Blutrückstände aus den Gefäßen zu entfernen. Anschließend wurden die Organe halbiert und aus einer Hälfte die Lymphozyten isoliert (2.8.2). Die übrige Hälfte wurde in 2 ml Gefäße, gefüllt mit Lysing Matrix M (MP Biomedicals, Eschwege) und mit 150 µl DMEM-Medium versetzt auf Eis gelagert. Die Organe wurden in einem FastPrep[®]-24 Homogenisator (MP Biomedicals, Eschwege) zweimal für 15 sek bei 15 m/ sek homogenisiert. Zwischen den beiden Läufen wurden die

Gefäße auf Eis gelagert. Abschließend wurden die Suspensionen bei 6500 xg, 4 °C, 10 min abzentrifugiert und der Überstand bei -80 °C gelagert.

2.8.13 GTKO-Zellkultur

Bei den GTKO-Zellen handelt es sich um eine adhärente immortalisierte MEF- (Maus embryonale Fibroblasten) Zelllinie, die einen genetischen *knock-out* im Galaktosyl-Transferase Gen trägt (die Zellen wurden freundlicher Weise von Prof. Raymond M. Welsh *University of Massachusetts Medical School* zur Verfügung gestellt). Die Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen bei 37 °C, 5 % CO₂ kultiviert und bei einer Konfluenz von ca. 80 % gesplittet. Dazu wurden die Zellen mit 37 °C warmen PBS-Puffer gewaschen und mit Trypsin-EDTA überschichtet. Der Trypsin-Verdau wurde für 5 min bei 37 °C durchgeführt und die Zellsuspension anschließend mit 37 °C warmem DMEM-Medium aufgefüllt. In einer neuen T75-Zellkulturflasche wurden schließlich 1/20 der Zellen in frischem DMEM-Medium ausgesät und bei 37 °C, 5 % CO₂ im Brutschrank für 3-4 Tage inkubiert.

2.8.14 Bestimmung der Viruslast in Lungen und Speicheldrüsen

Um die Menge an replikativem Virus in Organen zu messen, wurden Plaque-Assays mit GTKO-Zellen (siehe 2.8.13) durchgeführt. Hierzu wurden 8 x10⁴ GTKO-Zellen pro Kavität in 2 ml DMEM-Medium in einer 6-well Platte ausgesät und ü.N. bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Morgens wurde das Medium entfernt und 1 ml frisches warmes DMEM-Medium hinzugegeben. Zeitgleich wurden die Organsuspensionen (siehe 2.8.12) auf Eis aufgetaut und in einer Verdünnungsreihe von jeweils 1/10 in 6 Verdünnungsstufen von unverdünnt bis 10⁻⁵ verdünnt auf Eis angesetzt. Pro Kavität wurden 100 µl einer der Verdünnungsstufen gegeben. Anschließend wurden die Platten zweimal bei 800 xg für 15 min bei RT zentrifugiert. Zwischen den beiden Läufen wurden die Platten 180 ° horizontal gedreht. Die Platten wurden für 1 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Danach wurden die Zellen mit jeweils 4 ml einer 2 %igen Agaroselösung in EMEM-Medium überschichtet und für 6 Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ kultiviert. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Agaroseschicht mit Hilfe eines Spatels vorsichtig entfernt und jede Kavität mit 1 ml PBS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden durch die Zugabe von 1 ml Kristallviolett-Lösung für 5 min bei RT fixiert und gefärbt. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS-Puffer gewaschen und getrocknet.

Letztlich konnten die Plaques unter einem Binokular ausgezählt werden. Aus folgender Formel ergibt sich die Viruslast in log-Einheiten / Organ:

$$(PFU \times A) \times B = \text{Anzahl infektiöser Cytomegalieviren pro ml}$$

$$A = \text{Organvorverdünnung} \times \frac{1000 \mu\text{l}}{100 \mu\text{l}}$$

$$B = \frac{\text{Volumen}}{\text{Anzahl Organteile}}$$

Angegeben wurde der mCMV-Titer als \log_{10} der Anzahl an infektiösen Cytomegalieviren pro ml (\log_{10} PFU/ml).

2.9 Tierexperimentelle Methoden

2.9.1 Herstellung von infektiösen murinen Cytomegalieviren

Zur Vermehrung des mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) wurden weibliche Balb/c Mäuse mit 7×10^4 PFU i.p. infiziert. Nach 14 Tagen wurden die Mäuse euthanasiert und die Speicheldrüsen entnommen. Die Organe wurden mit Hilfe eines FastPrep®-24 Homogenisators (MP Biomedicals, Eschwege) in jeweils 1 ml HBSS Medium in 2 ml Tubes, gefüllt mit Lysing Matrix M (MP Biomedicals, Eschwege), zweimal bei 5 m/ sek für 15 sek auf Eis homogenisiert. Zwischen beiden Läufen wurden die Tubes für 5 min auf Eis gelagert. Anschließend wurde das Homogenat bei $6500 \times g$, 10 min, 4°C abzentrifugiert, der Überstand aliquotiert und bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung des Virustiters wurde ein Plaque-Assay (siehe 2.8.14) durchgeführt.

2.9.2 Depletion von Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen durch Injektion von Diphtherie-Toxin

Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen können durch die Gabe von Diphtherie-Toxin an DEREK-Mäuse (2.1.4) depletiert werden. Hierzu wurde den Mäusen einen Tag vor der Infektion, sowie an Tag 1 und 3 nach Infektion jeweils 30 ng DT/ g Körpergewicht intraperitoneal (i.p.) appliziert. Das verwendete Diphtherie-Toxin (Merck, Darmstadt) wurde nach Herstellerangaben in PBS gelöst und in Aliquots bei -80°C gelagert.

2.9.3 Infektion der Mäuse mit mCMV Smith strain

Die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden, sofern nicht anders angegeben, mit jeweils 5×10^4 PFU mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) gelöst in PBS i.p. infiziert.

3 Ergebnisse

3.1 Kinetik der T-Zellantwort während der akuten mCMV-Infektion

Die Infektion mit mCMV im Mausmodell verläuft in zwei Phasen, der akuten und der chronischen Phase. Um die Kinetik der T-Zellantwort während der akuten mCMV-Infektion im Balb/c Mausstamm zu untersuchen, wurden Foxp3-GFP Mäuse mit jeweils 5×10^4 PFU mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) i.p. infiziert. An Tag 4, 7, 14 und 21 nach der Infektion wurde der Verlauf der Infektion analysiert. Es zeigte sich, dass das Milzgewicht der infizierten Mäuse anstieg, an Tag sieben ein Maximum erreicht und anschließend wieder sank (Abb. 3.1, A). Die Erhöhung des Milzgewichtes korreliert mit der Zellzahl pro Milz (Kelsey et al., 1977) und stellte somit einen guten Indikator für die Immunantwort dar. Zusätzlich wurden zu den oben genannten Zeitpunkten T-Zellen aus der Milz, der Lunge und den Speicheldrüsen isoliert und der Phänotyp der Zellen im Vergleich zu Zellen aus naiven (nicht-infizierten) Tieren untersucht. Der Aktivierungsstatus der T-Zellen wurde über die Abnahme des Oberflächenmoleküls CD62L gemessen. CD62L, auch als L-Selektin bezeichnet, wird von naiven T-Zellen exprimiert und ist für die Einwanderung der Zellen in Lymphknoten wichtig. Nach Antigenkontakt regulieren T-Zellen die Expression von CD62L herab, um den Lymphknoten verlassen zu können und zum Ort der Entzündung zu migrieren (Arbones et al., 1994; Jung et al., 1988). T-Zellen, die aus Milz und Lunge der infizierten Mäuse isoliert wurden, hatten den geringsten Anteil an L-Selektin an Tag 7 p.i.. Im Vergleich zu $CD8^+$ T-Zellen zeigten $CD4^+$ T-Zellen nach 4 Tagen Infektion in der Milz keinen Unterschied in der CD62L-Expression zu Zellen aus naiven Tieren (Abb. 3.1, C und D). Bei $CD8^+$ T-Zellen in der Lunge war die erhöhte Aktivierung auch an Tag 21 p.i. noch zu messen, während sie in der Milz zu diesem Zeitpunkt wieder den Wert von Zellen aus naiven Tieren angenommen hatte (Abb. 3.1, C). In den Speicheldrüsen konnte in der $CD4^+$ T-Zellpopulation kein signifikanter Anstieg an $CD62L^{low}$ exprimierenden Zellen nachgewiesen werden, während die $CD8^+$ T-Zellen einen erhöhten Aktivierungsstatus bis 21 d.p.i. zeigten (Abb. 3.1, C und D).

Neben dem Aktivierungsstatus ist auch die Expression verschiedener Effektormoleküle entscheidend bei der Bekämpfung des Virus. Hierzu zählt unter anderem die in intrazellulären Vesikeln befindliche Serinprotease Granzyme B (GzmB). Daher wurden die isolierten T-Zellen intrazellulär mit einem spezifischen GzmB-AK gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Analog zu der Expression des Aktivierungsmarkers CD62L zeigte sich im $CD4^+$ T-Zellpool ein starker Anstieg GzmB-exprimierender Zellen bis Tag 7 p.i. (Abb. 3.2, A).

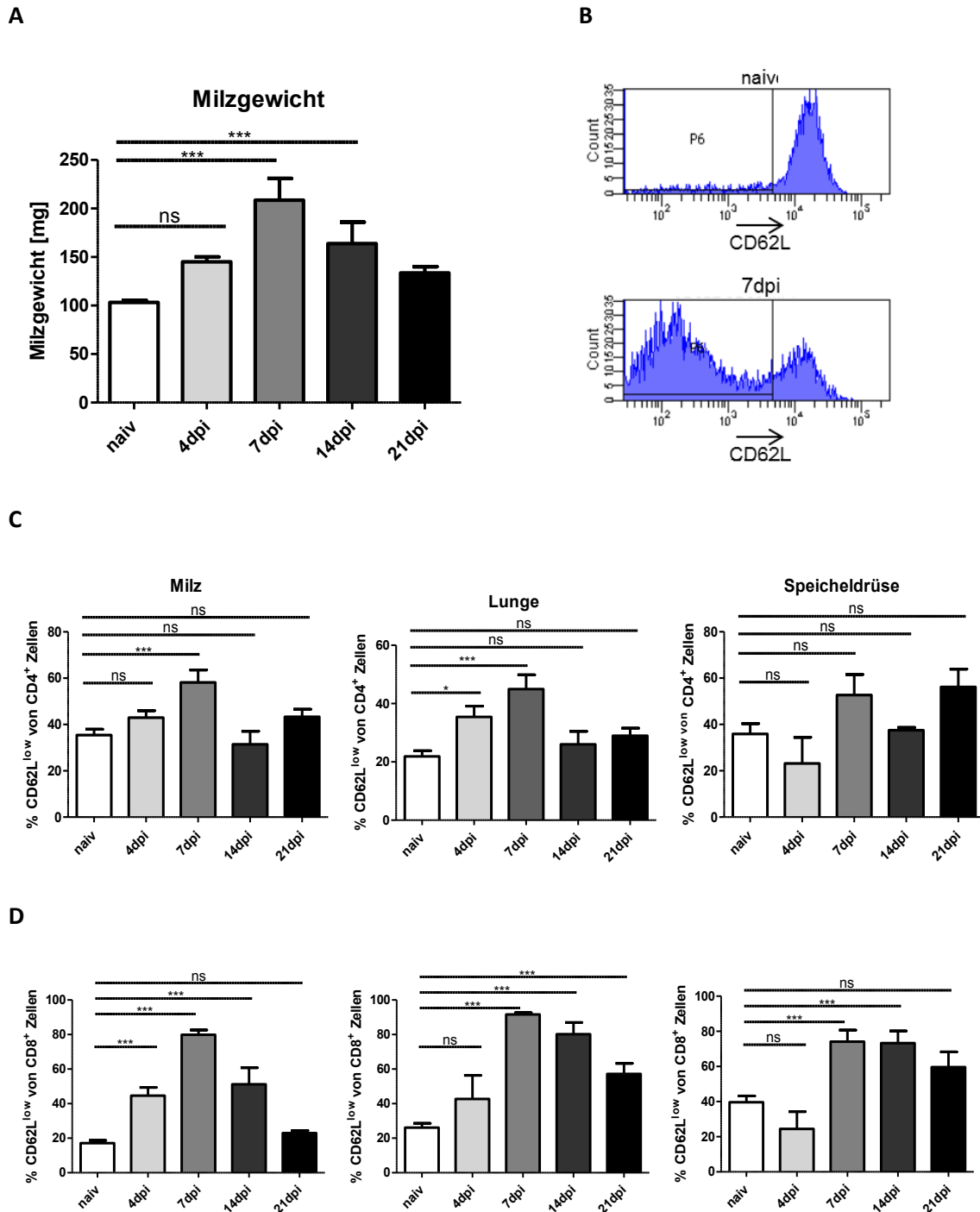
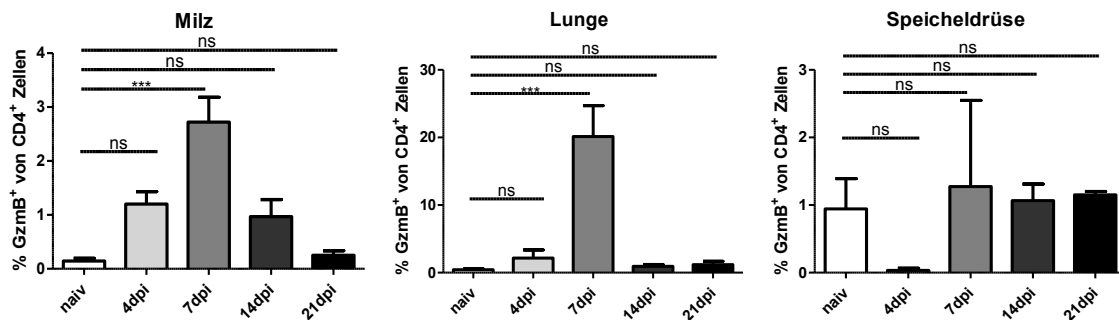


Abbildung 3.1: Milzgewicht und T-Zellaktivierungsstatus über den Verlauf der akuten mCMV-Infektion. Foxp3-GFP Mäuse wurden mit jeweils 5×10^4 PFU mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) i.p. infiziert. An den angegebenen Zeitpunkten wurden die Milzgewichte gemessen (A). Aus den Milzen, Lungen und Speicheldrüsen wurden Lymphozyten isoliert und der Aktivierungsstatus der T-Zellen über die verringerte Expression von CD62L durchflusszytometrisch ermittelt. Die Expression von CD62L ist von einem Experiment exemplarisch für CD8⁺ T-Zellen aus der Milz aus naiven Mäusen und aus Mäusen 7 d.p.i. als Histogramm gezeigt (B). Zusammengefasste Daten für CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen aus Milz, Lunge und Speicheldrüsen (C bzw. D). Als Kontrolle wurden jeweils naive Mäuse gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler ($n = 3$ pro Experiment, für 7, 14 und 21 d.p.i. sind jeweils zwei unabhängige Experimente zusammengefasst). Statistische Analysen wurden mittels One-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Test durchgeführt (ns = nicht signifikant, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

Im Anschluss nahm die Anzahl GzmB exprimierender Zellen deutlich ab und erreichte in der Lunge an Tag 14 p.i. wieder Werte naiver Mäuse, während sie in der Milz noch leicht erhöht blieb und erst an Tag 21 p.i. Werte von Zellen naiver Mäuse erreichte (Abb. 3.2, A). In den Speicheldrüsen war dieser Anstieg über den gesamten Messzeitraum nicht nachweisbar (Abb. 3.2, A). Auch im CD8⁺ T-Zellpool zeigte sich ein Peak an GzmB-exprimierenden Zellen an Tag 7 p.i. mit einer Abnahme an den folgenden Messzeitpunkten. Von der Milz über die Lunge zu den Speicheldrüsen war die Abnahme weniger stark. An Tag 21 p.i. exprimierten weiterhin 10 % aller CD8⁺ T-Zellen GzmB in den Speicheldrüsen (Abb. 3.2, B).

A



B

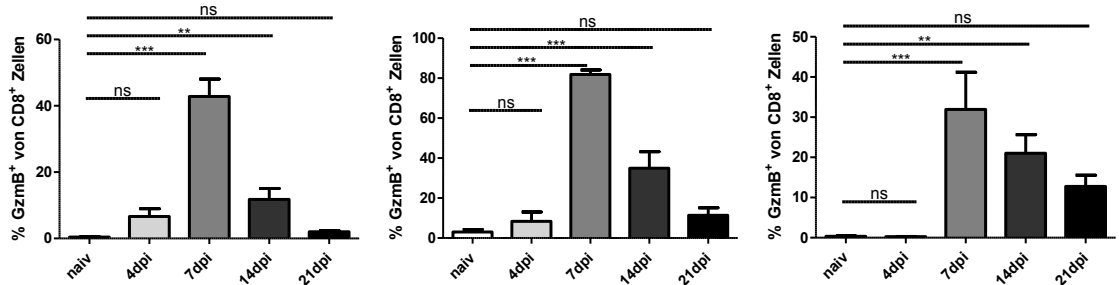


Abbildung 3.2: Anteil GzmB-exprimierender T-Zellen während der akuten mCMV-Infektion. Foxp3-GFP Mäuse wurden mit mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) (5×10^4 PFU i.p.) infiziert. Nach 4, 7, 14 und 21 d.p.i. wurden die Lymphozyten aus den Milzen, Lungen und Speicheldrüsen isoliert. Durchflusszytometrisch wurde der jeweilige Anteil GzmB exprimierender CD4⁺ (A) bzw. CD8⁺ (B) T-Zellen ermittelt. Als Kontrolle dienten jeweils naive Geschwistertiere. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte mit Standardfehler (n= 3 pro Experiment, für 7, 14 und 21 d.p.i. sind jeweils zwei unabhängige Experimente zusammengefasst). Statistische Analysen wurden mittels One-way ANOVA mit anschließendem Dunett's Test durchgeführt (ns= nicht signifikant, ** p< 0,01, *** p< 0,001).

Ein weiteres wichtiges Effektormolekül, welches von T-Zellen während einer mCMV Infektion exprimiert wird, ist das Zytokin Interferon γ (IFN γ) (Zandvliet et al., 2009). Die Expression von IFN γ wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Dazu wurden die Zellen nach Isolation für 4,5 h durch anti-CD3 in Gegenwart eines Inhibitors des Golgi-Apparates *in vitro* restimuliert, um IFN γ in der Zelle anzureichern. Anschließend folgte eine intrazelluläre Färbung der Zellen mit einem spezifischen IFN γ -AK. Die Messung der Zellen aus der Milz und der Lunge

zeigte, dass nach siebentägiger Infektion der Anteil an IFN γ -produzierender CD4 $^{+}$ T-Zellen anstieg. Dies war besonders in der Lunge zu erkennen (Abb. 3.3). Nach 14 Tagen Infektion ging dieser Anteil stark zurück und lag nach 21 Tagen wieder auf dem Niveau von naiven T-Zellen. In den Speicheldrüsen war ein Anstieg der Interferon γ -produzierenden CD4 $^{+}$ T-Zellen zu keinem der gemessenen Zeitpunkte nachzuweisen (Abb. 3.3).

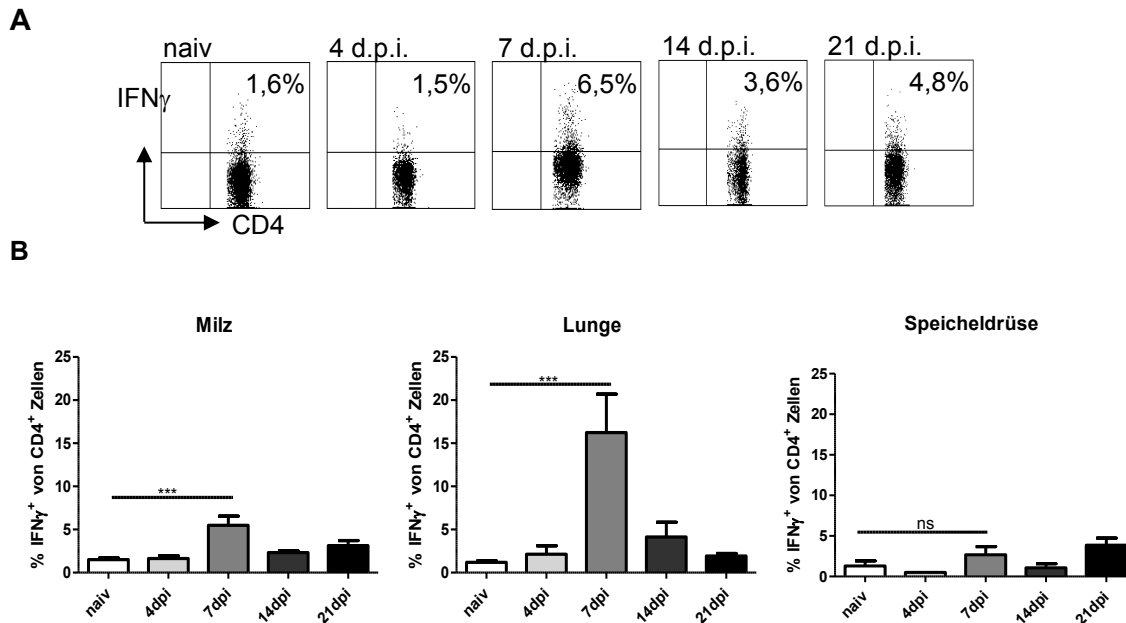
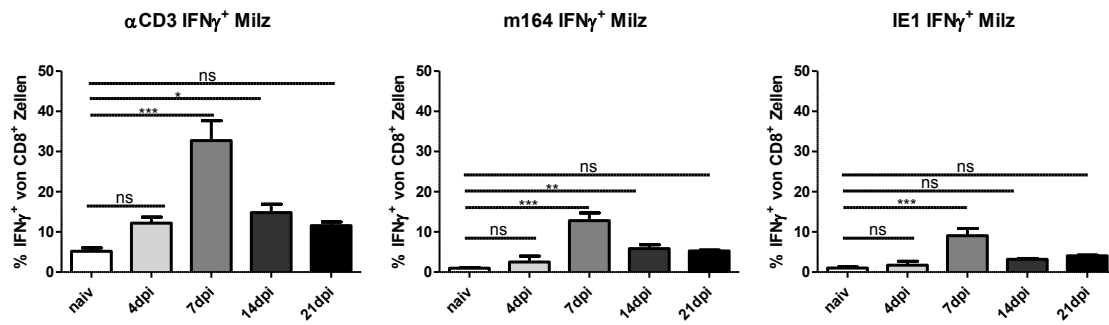


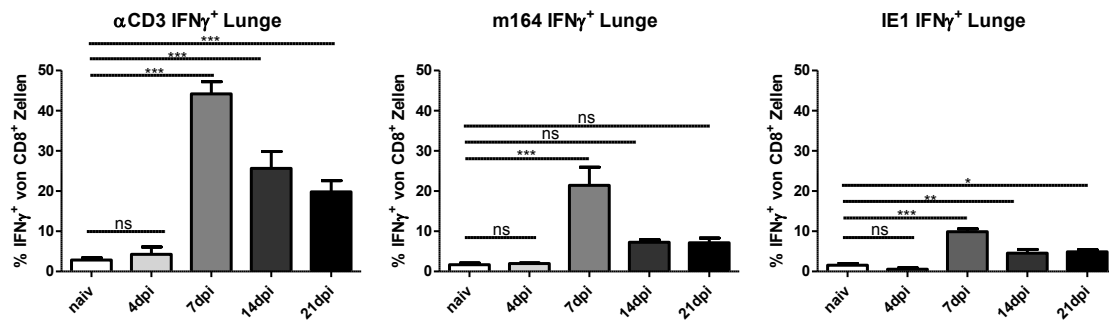
Abbildung 3.3: Anteil an IFN γ -produzierenden CD4 $^{+}$ T-Zellen im Verlauf der akuten mCMV-Infektion. An den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion mit 5×10^4 PFU mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) wurden Lymphozyten aus der Milz, Lunge und Speicheldrüsen von Foxp3-GFP Mäusen isoliert. Die Zellen wurden *in vitro* für 4,5 h in Anwesenheit von α CD3 (0,5 μ g/ml), IL-2 (0,1 U/ml) und Brefeldin A (10 μ g/ml) stimuliert. Anschließend wurde der prozentuale Anteil IFN γ -produzierender Zellen an CD4 $^{+}$ T-Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Dot Plots sind exemplarisch für die Milz gezeigt (A). Als Kontrolle dienten jeweils naive Geschwistertiere. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler (B). $n = 3$ pro Experiment, für 7, 14 und 21 d.p.i. sind jeweils zwei unabhängige Experimente zusammengefasst. Statistische Analysen wurden mittels One-way ANOVA mit anschließendem Dunett's Test durchgeführt (ns= nicht signifikant, *** $p < 0,001$).

Neben den CD4 $^{+}$ T-Zellen produzieren auch CD8 $^{+}$ T-Zellen große Mengen an IFN γ während viraler Infektionen. Anders als bei den CD4 $^{+}$ T-Zellen sind für CD8 $^{+}$ T-Zellen des Balb/c Mausstammes Epitope antigenspezifischer Effektorzellen bekannt (Holtappels et al., 1998; Holtappels et al., 2002a). Daher konnten antigenspezifische CD8 $^{+}$ T-Zellen durch Zugabe des bekannten Antigens *in vitro* restimuliert und analysiert werden. In Abbildung 3.4 ist das Ergebnis der Analyse gezeigt. Sowohl in der Milz, als auch in der Lunge kam es 7 d.p.i. zu einem starken Anstieg an IFN γ -produzierenden CD8 $^{+}$ T-Zellen (Abb. 3.4, A und B).

A



B



C

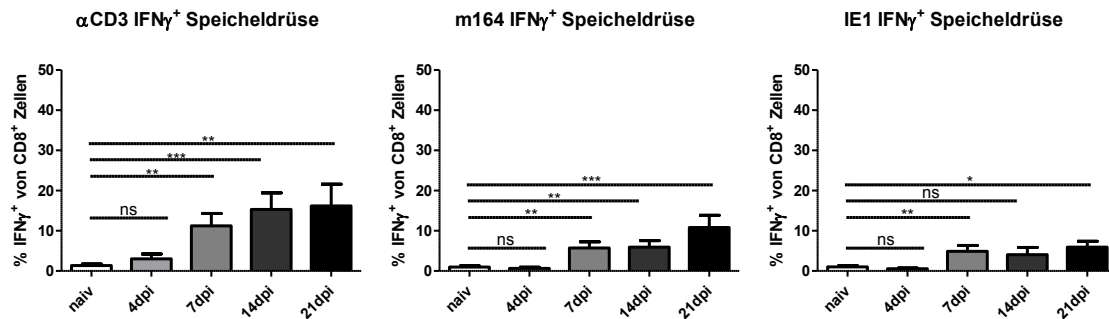
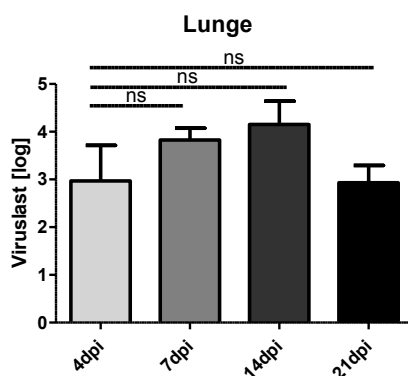


Abbildung 3.4: Anteil an IFN γ -produzierenden CD8⁺ T-Zellen im Verlauf der akuten mCMV-Infektion. Foxp3-GFP Mäuse wurden mit mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) (5×10^4 PFU i.p.) infiziert. Nach 4, 7, 14 und 21 d.p.i. wurden die Lymphozyten aus den Milzen (A), Lungen (B) und Speicheldrüsen (C) isoliert. Die Zellen wurden *in vitro* für 4,5 h in Anwesenheit von α CD3 (0,5 μ g/ml), IL-2 (0,1 U/ml) und Brefeldin A (10 μ g/ml) stimuliert. Um antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen zu messen wurde α CD3 in weiteren Ansätzen durch die MHC-I restringierten mCMV-spezifischen Peptide m164 und IE1 (10 μ g/ml) ersetzt. Anschließend wurde der prozentuale Anteil IFN γ -produzierender Zellen an CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Als Kontrolle dienten jeweils naive Geschwistertiere. Die Graphen zeigen die Mittelwerte mit Standardfehler (n= 3 pro Experiment, für 7, 14 und 21 d.p.i. sind jeweils zwei unabhängige Experimente zusammengefasst). Statistische Analysen wurden mittels One-way ANOVA mit anschließendem Dunett's Test durchgeführt (ns= nicht signifikant, * p< 0,05, ** p< 0,01, *** p< 0,001).

Der Anstieg war sowohl in der gesamten Population (vgl. Abb. 3.4, linke Spalte), als auch bei den antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen zu erkennen (vgl. Abb. 3.4, mittlere und rechte Spalte). Dieser Anteil ging nach 14 Tagen Infektion zurück und lag nach 21 Tagen nur knapp über dem Niveau von naiven T-Zellen (Abb. 3.4). Anders als in der Milz und der Lunge stieg der Anteil IFN γ -produzierender CD8⁺ T-Zellen in den Speicheldrüsen über den gesamten Messzeitraum an (Abb. 3.4). Allerdings blieb der Prozentsatz in der Gesamtpopulation mit maximal 15 % weit unter dem in der Milz und Lunge gemessenen mit 30-40 % (Abb. 3.4, C).

Als Kontrolle für eine erfolgte Infektion der Organe mit mCMV wurden Plaque Assays durchgeführt. Hierbei wurde die Menge an replizierendem Virus innerhalb des Organs ermittelt. Wie in Abbildung 3.5 zu erkennen, war zu jedem Zeitpunkt nach Infektion Virus in der Lunge und den Speicheldrüsen nachzuweisen. In der Lunge stieg die Menge bis zum Tag 14 nach Infektion an und fiel an Tag 21 wieder auf ein Niveau wie an Tag 4 nach Infektion. In den Speicheldrüsen wurden im Vergleich zur Lunge ungefähr doppelt so hohe Virustiter ermittelt und auch 21 d.p.i. war noch eine hohe Replikationsrate des Virus festzustellen (Abb. 3.5).

A



B

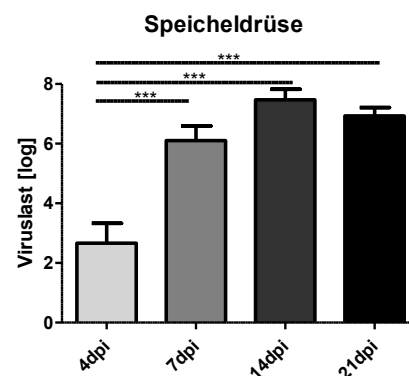
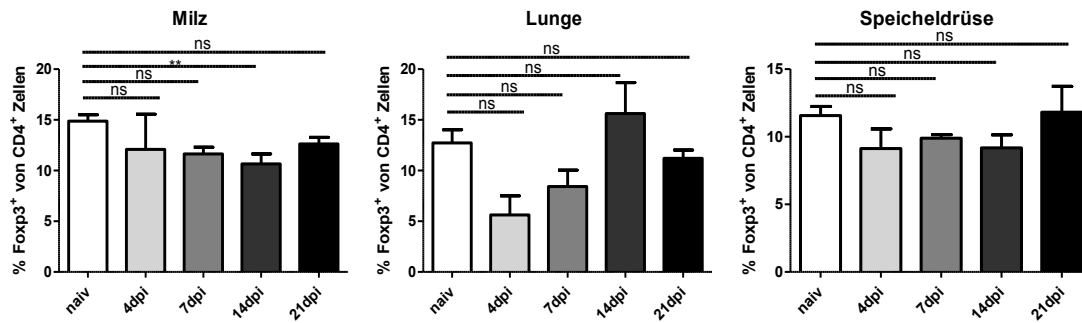


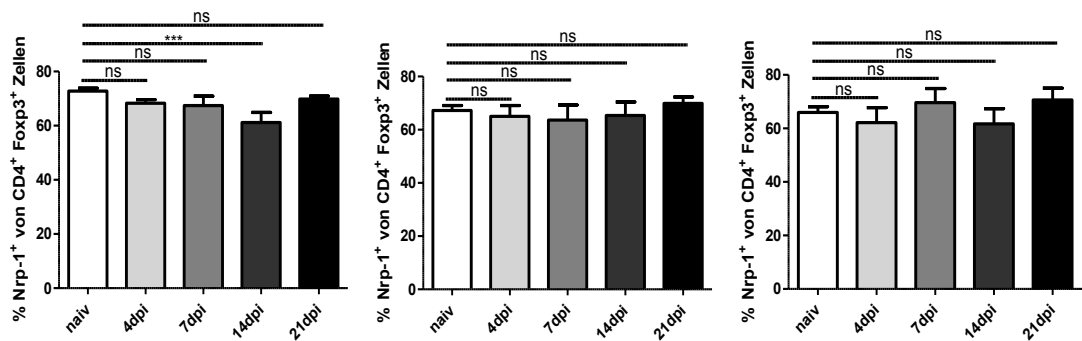
Abbildung 3.5: Viruslast während der akuten mCMV-Infektion in der Lunge und den Speicheldrüsen. An den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion mit 5×10^4 PFU mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) wurden die Lungen (A) und Speicheldrüsen (B) aus Foxp3-GFP Mäusen entnommen und mittels Plaque Assay die Viruslast ermittelt (n= 3 pro Experiment, für 7, 14 und 21 d.p.i. sind jeweils zwei unabhängige Experimente zusammengefasst). Statistische Analysen wurden mittels One-way ANOVA mit anschließendem Dunett's Test durchgeführt (ns= nicht signifikant, *** p< 0,001).

Da das Ziel der vorliegenden Arbeit die Untersuchung des Einflusses regulatorischer T-Zellen auf den Infektionsverlauf war, wurde als nächstes der Phänotyp der Tregs untersucht. Als Marker zur Identifizierung von Tregs ist der Transkriptionsfaktor Foxp3 beschrieben.

A



B



C

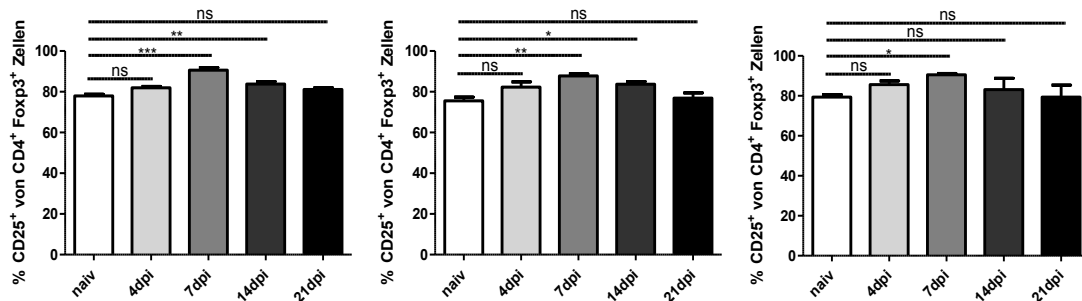


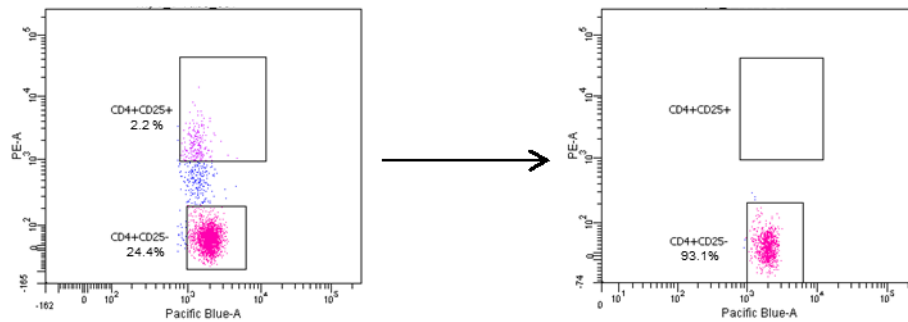
Abbildung 3.6: Anteil und Phänotyp Foxp3⁺ CD4⁺ regulatorischer T-Zellen im Verlauf der akuten mCMV-Infektion. Zu den angegebenen Zeitpunkten der akuten mCMV-Infektion wurden aus infizierten Foxp3-Mäusen (5×10^4 PFU i.p. mCMV Smith strain (ATCC VR-1399)) Lymphozyten aus der Milz, Lunge und den Speicheldrüsen isoliert. Die Expression der Treg-Marker Foxp3 (A), Nrp-1 (B) und CD25 (C) wurden durchflusszytometrisch auf CD4⁺ (A) bzw. CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen (B, C) gemessen. Als Kontrolle dienten jeweils naive Geschwistertiere. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler (n= 3 pro Experiment, für 7, 14 und 21 d.p.i. sind jeweils zwei unabhängige Experimente zusammengefasst). Statistische Analysen wurden mittels One-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Test durchgeführt (ns= nicht signifikant, * p< 0,05, ** p< 0,01, *** p< 0,001).

Er gehört zur Familie der *forkhead/winged-helix* Transkriptionsfaktoren und kodiert das Transkriptionsprodukt Scurfin in Mäusen (Khatti R, 2003; Fontenot et al., 2003). Da im Versuch Foxp3-GFP Mäuse infiziert wurden, die ein eGFP (engl.: *enhanced green fluorescent protein*) unter der Kontrolle des Foxp3-Promotors exprimieren, konnte der Anteil und der Phänotyp der regulatorischen T-Zellen durchflusszytometrisch anhand der GFP-

Expression untersucht werden. In Abbildung 3.6 (A) ist der prozentuale Anteil Foxp3⁺ Tregs an CD4⁺ T-Zellen über den akuten Infektionsverlauf graphisch dargestellt. In der Milz nahm er in den ersten Tagen ab und stieg 21 d.p.i. wieder an. In den Speicheldrüsen und der Lunge war dieselbe Tendenz zu sehen, obwohl die Daten hier aufgrund fehlender signifikanter Unterschiede keine definitive Aussage zulassen. Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche den Rezeptor Neuropilin-1 (Nrp-1) (Bruder et al., 2004). Es wurde postuliert, dass induzierte Tregs diesen Rezeptor geringer exprimieren als natürliche Tregs und man so nTregs von iTregs unterscheiden könne (Yadav et al., 2012). Daher wurde die Expression von Nrp-1 auf Tregs während der akuten mCMV-Infektion untersucht. An Tag 14 nach Infektion war die Expression an Nrp-1 in der Milz auf CD4⁺ Foxp3⁺ Tregs signifikant verringert. Zu allen anderen Zeitpunkten konnten hingegen keine Unterschiede in der Expression von Nrp-1 auf Tregs isoliert aus der Milz, der Lunge oder den Speicheldrüsen erkannt werden (Abb. 3.6, B). Neben Nrp-1 exprimieren CD4⁺ Foxp3⁺ Tregs auch CD25, die α -Untereinheit des IL-2 Rezeptors (Sakaguchi et al., 1995). CD25 wird von T-Zellen nach Antigenkontakt hochreguliert und dient auch als Aktivierungsmarker (Depper et al., 1984). In allen untersuchten Organen zeigte sich ein Anstieg an CD25⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺ Foxp3⁺ T-Zellpopulation. Der Anstieg erreichte sein Maximum an Tag 7 nach Infektion und hatte 21 d.p.i. wieder das Niveau naiver T-Zellen erreicht (Abb. 3.6, C).

Als weiterer Analysenschritt der phänotypischen Untersuchung der Tregs sollte ihre suppressive Fähigkeit während der mCMV-Infektion untersucht werden. Dazu wurden CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen aus infizierten Foxp3-GFP Mäusen mit einem FACS-Aria (BD Biosciences, Heidelberg) sortiert und in einem *in vitro* Inhibitionstest eingesetzt. Für diesen Test wurden zusätzlich CD4⁺ CD25⁻ Responder T-Zellen, isoliert aus naiven Thy1.1-Mäusen, sortiert und mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH-26 markiert. In Abbildung 3.7 sind die Zellen vor und nach dem Sortierungsschritt beispielhaft für eine Sortierung gezeigt. Die CD4⁺ CD25⁻ Responderzellen wurden von 24,4 % bis auf 93,1 % angereichert (Abb. 3.7, A). In Abbildung 3.7 B ist die Anreicherung der CD4⁺ Foxp3⁺ Tregs zu erkennen. Da die Zellen aus einer Foxp3-GFP Maus isoliert wurden, exprimieren alle Foxp3⁺ Zellen GFP, worüber sie sortiert werden konnten. Die Tregs wurden durch den Sortierschritt von 3,0 % auf 93,0 % angereichert. Zeitgleich wurden die Effektorzellen der infizierten Foxp3-GFP Mäuse für einen Proliferationstest sortiert. Hierfür wurden die CD4⁺ Foxp3⁻ (GFP⁻) Zellen von 18,3 % auf 86,8 % angereichert (Abb. 3.7, B). Die Responder T-Zellen wurden mit den Tregs (Verhältnis 1 : 1) und mit bestrahlten APCs für 72 h inkubiert. Für die Stimulation der Responder T-Zellen wurde α CD3 hinzugegeben. In Abbildung 3.8 (links, oberes Histogramm) ist der Verlust des Fluoreszenzfarbstoffs PKH-26 in der Responder T-Zellpopulation histographisch dargestellt.

A



B

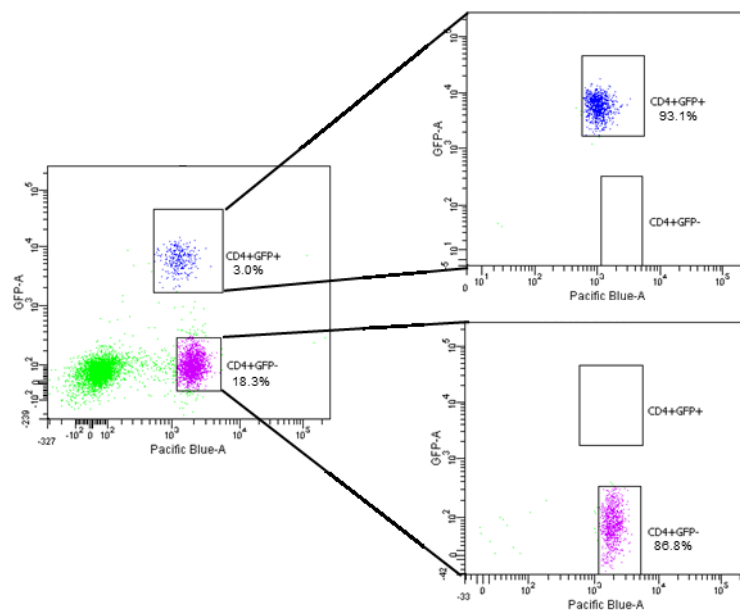


Abbildung 3.7: Anreicherungsstrategie für Responder- und Effektor- und Treg-Zellen für einen Proliferations- oder Suppressionstest. Aus Thy1.1. Mäusen wurden CD4⁺ T-Zellen mittels magnetischer Zellsortierung angereichert und mit CD4-PB und CD25-APC Antikörpern gefärbt. Anschließend wurden die CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen mit einem FACS-Aria (BD Biosciences, Heidelberg) isoliert (A). Aus mCMV infizierten oder naiven Foxp3-GFP Mäusen wurden CD4⁺ T-Zellen über die magnetische Zellsortierung angereichert und mit CD4-PB gefärbt. Die CD4⁺ Foxp3⁺ Tregs und die CD4⁺ Foxp3⁻ Effektorzellen wurden mit einem FACS-Aria (BD Biosciences, Heidelberg) sortiert (B).

Die Zugabe von Tregs führte zu einer Verminderung der Proliferation der Responder T-Zellen, zu erkennen am höheren PKH-26 Signal (Abb. 3.8, links mittleres und unteres Histogramm). Die zusammengefassten Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen sind in Abbildung 3.8 (rechts) dargestellt. Es ließ sich für keinen der untersuchten Messzeitpunkte ein Unterschied in der suppressiven Fähigkeit von Tregs aus infizierten Tieren im Vergleich zu Tregs aus naiven Tieren erkennen.

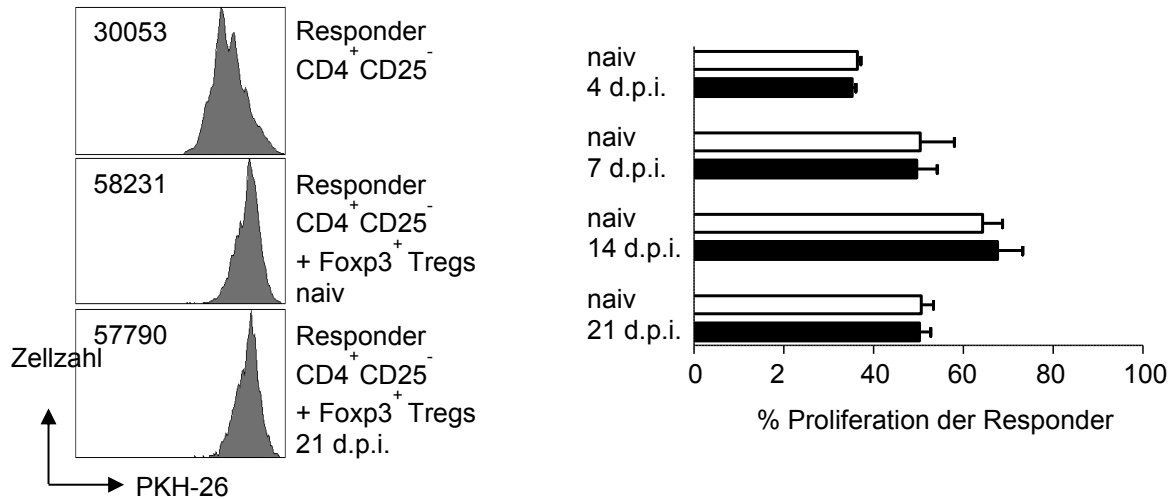


Abbildung 3.8: Suppressionseigenschaften regulatorischer T-Zellen während einer akuten mCMV-Infektion. Foxp3-GFP Mäuse wurden mit 5×10^4 PFU mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) i.p. infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden $CD4^+ Foxp3^+$ Tregs sortiert und in einem *in vitro* Suppressionsassay eingesetzt. Sortierte $CD4^+ CD25^-$ Responder T-Zellen wurden mit PKH-26 markiert und mit bestrahlten APCs und $\alpha CD3$ stimuliert. Zusätzlich wurden die Tregs hinzugegeben und die Proliferation der Responder T-Zellen nach 72 h Inkubation durchflusszytometrisch gemessen. Als Kontrolle wurden Tregs aus naiven Geschwistertieren mitgemessen (n= 3 pro Experiment, für 7, 14 und 21 d.p.i. sind jeweils zwei individuelle Experimente zusammengefasst).

Neben der Inhibition durch regulatorische T-Zellen kann die T-Zellantwort intrinsisch auf der Ebene der Effektor T-Zellen behindert sein. So sind während Infektionen mit dem Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) in der Maus sogenannte „erschöpfte“ (engl. *exhausted T-cells*) Effektor T-Zellen nachgewiesen worden (Barber et al., 2006). Diese T-Zellen haben eine geringere Proliferationskapazität als T-Zellen aus naiven Mäusen. Um dies während der mCMV-Infektion zu untersuchen, wurden $CD4^+ Foxp3^-$ Effektor T-Zellen sortiert und mit PKH-26 fluoreszenzmarkiert. Diese wurden mit bestrahlten APCs und $\alpha CD3$ für 72 h stimuliert. Anschließend wurde die Proliferation über die Abnahme des Fluoreszenzsignals für PKH-26 durchflusszytometrisch gemessen (Abb. 3.9, A). Die Untersuchungen zu den Proliferationseigenschaften der Effektor T-Zellen aus infizierten Tieren an den angegebenen Messzeitpunkten der akuten mCMV-Infektion zeigten keine Unterschiede zu Zellen aus naiven Geschwistertieren (Abb. 3.9, B).

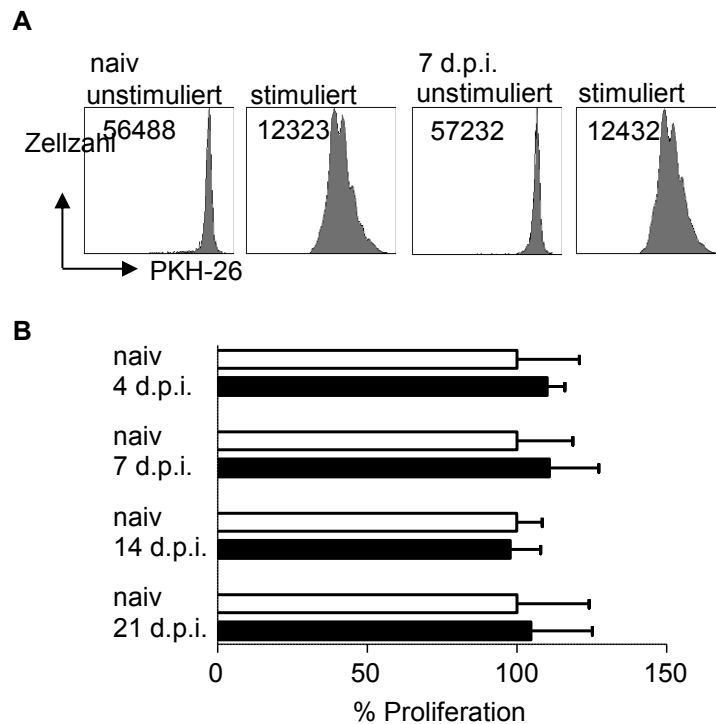


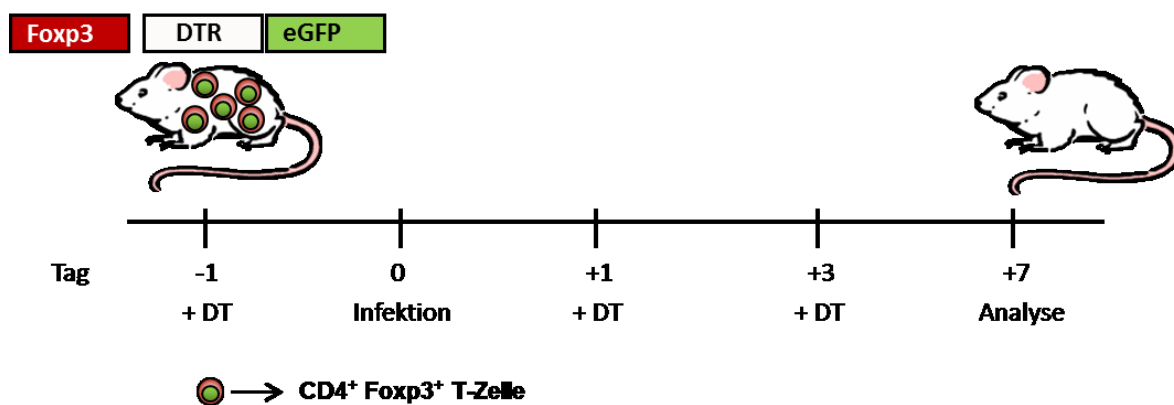
Abbildung 3.9: Proliferationseigenschaften von Effektor T-Zellen während einer akuten mCMV-Infektion. Foxp3-GFP Mäuse wurden mit 5×10^4 PFU mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) i.p. infiziert. An den angegebenen Zeitpunkten wurden die $CD4^+$ Foxp3 $^-$ Effektor T-Zellen sortiert, mit PKH-26 markiert und mit bestrahlten APCs und $\alpha CD3$ stimuliert. Die Proliferation wurde anhand der Abnahme des PKH-26 Signals durchflusszytometrisch gemessen. Als Kontrolle wurden jeweils naive Geschwistertiere mitgemessen (n= 3 pro Experiment, für 7, 14 und 21 d.p.i. sind jeweils zwei individuelle Experimente zusammengefasst).

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass eine akute mCMV-Infektion im Balb/c-Mausstamm zu einer systemischen Aktivierung der adaptiven Immunantwort an Tag sieben führte. Dies zeigte sich an einem erhöhten Milzgewicht und aktivierten T-Zellen in den drei untersuchten Organen Milz, Lunge und Speicheldrüse (Abb. 3.1). Innerhalb des T-Zellpools produzierte ein prozentual größerer Anteil der Zellen Effektormoleküle wie GzmB und IFN γ . Dies war im $CD8^+$ T-Zellpool auch in antigenspezifischen Zellen nachweisbar (Abb. 3.4). Die $CD4^+$ Foxp3 $^+$ regulatorischen T-Zellen nahmen in der akuten Phase der mCMV-Infektion prozentual ab, zeigten aber einen größeren Anteil aktivierter Zellen (Abb. 3.6). Isolierte Tregs aus infizierten Mäusen waren in der Lage $CD4^+$ T-Zellen in einem *in vitro* Suppressionsassay in ihrer Proliferation zu inhibieren. Im Vergleich zu regulatorischen T-Zellen isoliert aus naiven Mäusen war ihre Suppressionseffizienz identisch (Abb. 3.8). Die Proliferationsrate von $CD4^+$ Foxp3 $^-$ T-Zellen isoliert aus infizierten Mäusen wies ebenfalls keinen Unterschied zu denen isoliert aus naiven Geschwistertieren auf (Abb. 3.9).

3.2 Depletion Foxp3^+ regulatorischer T-Zellen während der akuten mCMV-Infektion

CD4^+ Foxp3^+ regulatorische T-Zellen sind nicht nur wichtig für die effektive Verhinderung von Autoimmunerkrankungen, sondern haben wie bereits erwähnt auch einen Einfluss auf die Stärke der Immunantwort während Infektionskrankheiten. Nachdem in Abschnitt 3.1 ein höherer Anteil an CD25^+ aktivierten Foxp3^+ Tregs in mCMV-infizierten Tieren nachgewiesen wurde, sollte ihr Einfluss als nächstes während der akuten mCMV-Infektion *in vivo* untersucht werden.

A



B

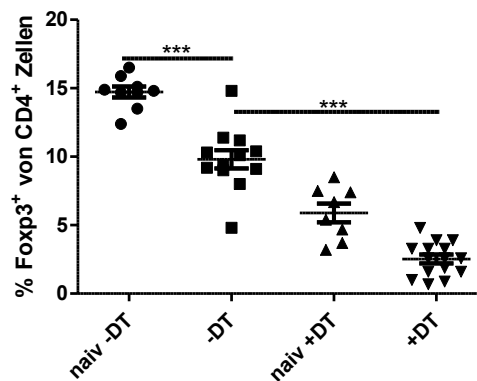


Abbildung 3.10: Depletion von Foxp3^+ CD4^+ Zellen in DERE-Mäusen während der akuten mCMV-Infektion. Schematische Darstellung der Depletion von Tregs in DERE-Mäusen während der akuten mCMV-Infektion (A). Den Mäusen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten jeweils 30 ng DT/ mg Körpergewicht gelöst in PBS i.p. appliziert. Sie wurden mit 5×10^4 PFU mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) i.p. infiziert. 7 d.p.i. wurden Lymphozyten aus den Milzen isoliert und der prozentuale Anteil Foxp3^+ an CD4^+ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (B). Als Kontrollen wurden naive und Treg-depletierte naive Mäuse gemessen. $n = 1-3$, gezeigt sind die zusammengefassten Daten von fünf unabhängigen Experimenten. Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (***) $p < 0,001$.

Dazu wurde das DEREK-Mausmodell genutzt. DEREK-Mäuse exprimieren den Diphtherie-Toxin-Rezeptor unter der Kontrolle des Foxp3-Promotors. Durch die intraperitoneale Gabe von Diphtherie-Toxin (DT) können Foxp3-exprimierende Zellen in DEREK-Mäusen *in vivo* spezifisch depletiert werden. In Abbildung 3.10 (A) ist schematisch der Versuchsplan aufgezeigt. Einen Tag vor und an Tag 1 und 3 p.i. wurde DT appliziert und 7 d.p.i. wurde die Immunantwort der Mausgruppen analysiert. Die DT Gabe führte zu einer Depletion der Foxp3⁺ T-Zellen wie in Abbildung 3.10 (B) zu erkennen ist.

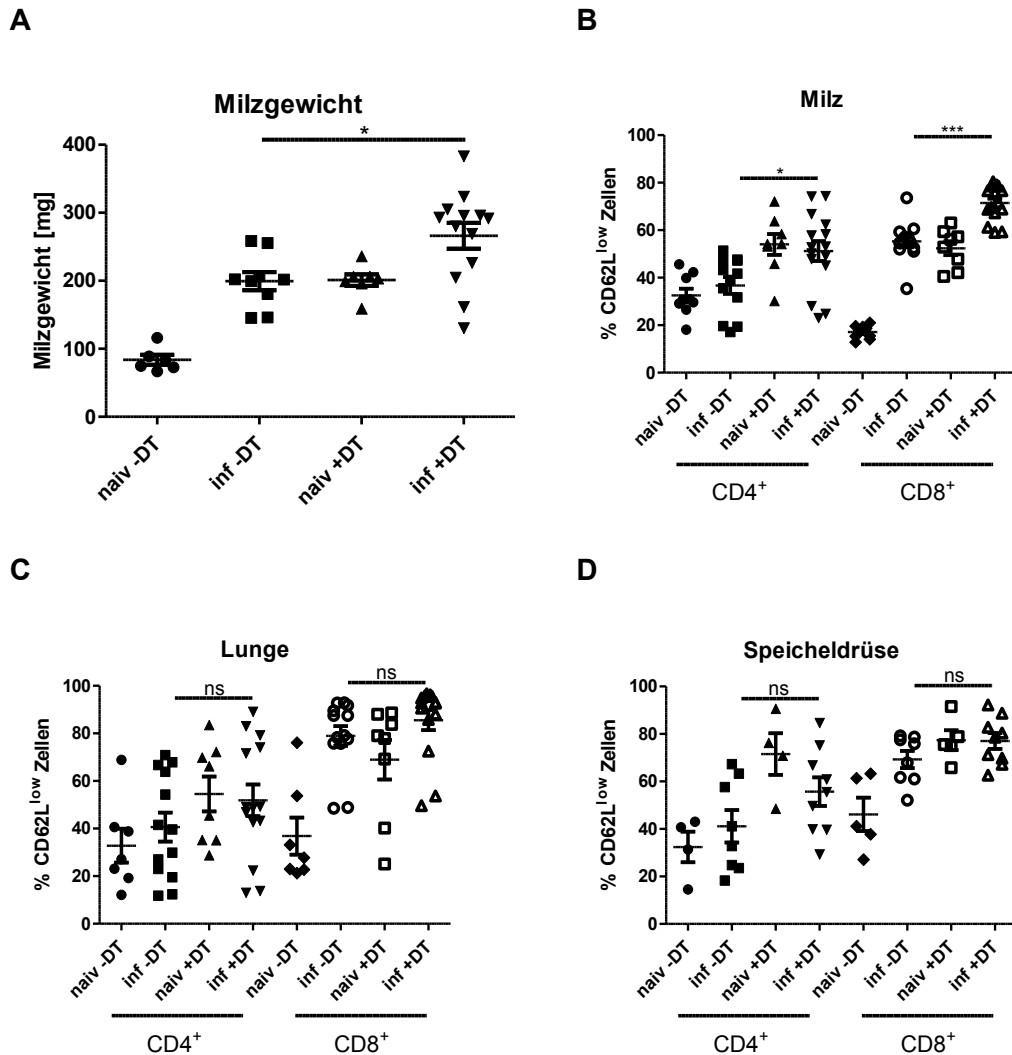
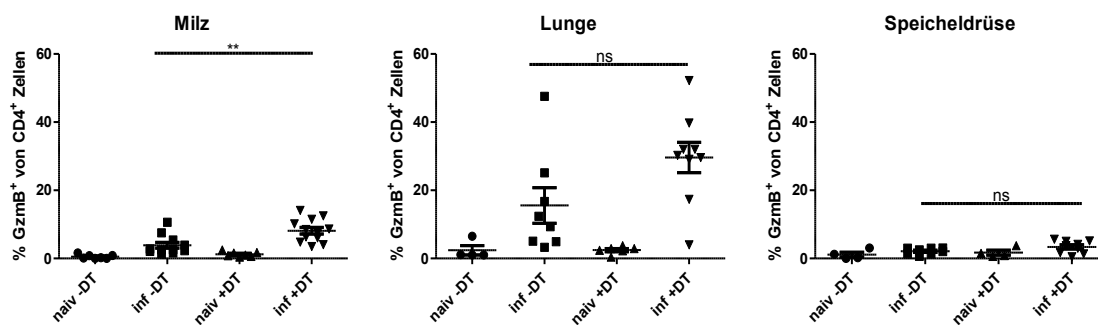


Abbildung 3.11: Erhöhte Milzgewichte und T-Zellaktivierung über den Verlauf der akuten mCMV-Infektion nach Treg-Depletion. DEREK-Mäuse wurden mit 5×10^4 PFU mCMV-Smith strain (ATCC-VR1399) infiziert. Durch DT-Gabe an Tag -1, 1 und 3 nach Infektion wurden CD4⁺ Foxp3⁺ T-Zellen depletiert. An Tag 7 p.i. wurden die Milzgewichte bestimmt (A). Der Aktivierungsstatus der T-Zellen isoliert aus der Milz (B), Lunge (C) und den Speicheldrüsen (D) wurde durchflusszytometrisch über die Expression des Oberflächenmoleküls CD62L auf den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gemessen. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Zur Kontrolle wurden jeweils unbehandelte naive und naive Treg-depletierte DEREK-Mäuse mitgemessen (n= 1-3, gezeigt sind drei unabhängige Experimente). Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (ns= nicht signifikant, * p< 0,05, *** p< 0,001).

Darüber hinaus zeigte sich auch hier wie bereits in Abschnitt 3.1 ein geringerer prozentualer Anteil an Foxp3⁺ Tregs in den nicht depletierten infizierten Mäusen im Vergleich zu nicht depletierten naiven Mäusen. Beim Vergleich der infizierten Treg-defizienten Tiere zu den infizierten nicht depletierten zeigen diese eine starke Zunahme des Milzgewichtes an Tag 7 p.i. (Abb. 3.11, A). Zusätzlich wiesen sie einen erhöhten Anteil an aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Milz auf (Abb. 3.11, B). Obwohl diese Beobachtung tendenziell auch in der Lunge und den Speicheldrüsen zu sehen war, sind die Daten statistisch nicht signifikant (Abb. 3.11, C und D). Um die stärkere Immunantwort in den depletierten Mäusen weiter zu untersuchen, wurde der prozentuale Anteil an GzmB-exprimierenden T-Zellen im Folgenden gemessen. Auch hier zeigte sich ein signifikanter Anstieg an GzmB-produzierenden Zellen sowohl innerhalb des CD4⁺, als auch des CD8⁺ T-Zellpools in der Milz. Die gleiche Tendenz war in der CD4⁺ T-Zellpopulation (Abb. 3.12, A) in der Lunge aber auch bei den CD8⁺ T-Zellen zu erkennen (Abb. 3.12, B). Für die Lunge waren die Daten allerdings nicht signifikant.

A



B

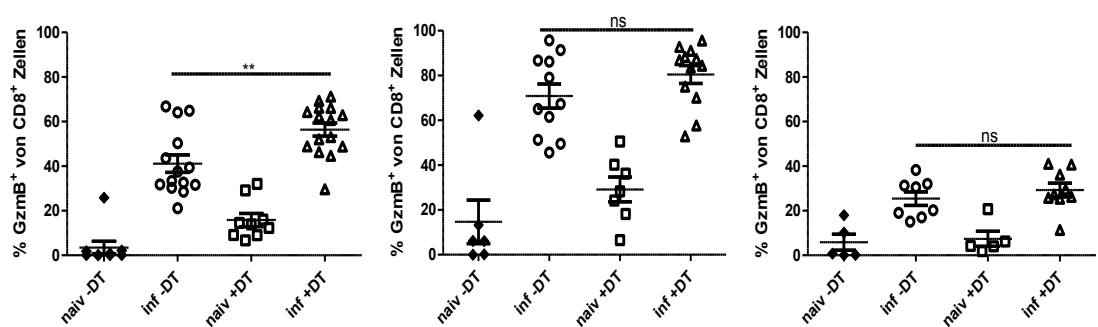


Abbildung 3.12: Verstärkte Expression von GzmB auf T-Zellen in Treg-depletierten Mäusen sieben Tage nach mCMV-Infektion. Sieben Tage nach Infektion von DEREK-Mäusen mit 5×10^4 PFU mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) und Depletion von Foxp3⁺ T-Zellen (DT-Gabe an Tag -1, 1 und 3 p.i.) wurden die Lymphozyten isoliert. Die Expression von GzmB auf CD4⁺ T-Zellen (A) und CD8⁺ T-Zellen (B) wurde in der Milz, der Lunge und den Speicheldrüsen mittels FACS-Analyse bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert ein Versuchstier. Als Kontrollen wurden naive unbehandelte und naive Treg-depletierte DEREK-Mäuse gemessen (n= 1-3, gezeigt sind zusammengefasste Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten). Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (ns= nicht signifikant, ** p< 0,01).

Aber wie auch bei der Expression des Oberflächenmoleküls CD62L (Abb. 3.11) waren in der Lunge und auch den Speicheldrüsen keine signifikanten Unterschiede nachweisbar (Abb. 3.12). Wie bereits erwähnt produzieren T-Zellen während viraler Infektionen große Mengen IFN γ . Daher sollte im Folgenden der Einfluss von regulatorischen T-Zellen auf die Sekretion von IFN γ während der akuten mCMV-Infektion untersucht werden. In Abbildung 3.13 ist der Anteil IFN γ -produzierender T-Zellen innerhalb des CD4 $^{+}$ T-Zellpools an Tag 7 nach Infektion in infizierten unbehandelten und Treg-depletierten Mäusen, sowie in den naiven Kontrollen, graphisch dargestellt. In beiden untersuchten Organen war ein signifikanter Anstieg an IFN γ -produzierenden CD4 $^{+}$ T-Zellen nach Treg-Depletion und Infektion zu erkennen. Im Vergleich zur Milz war er in der Lunge stärker ausgeprägt (Abb. 3.13, B).

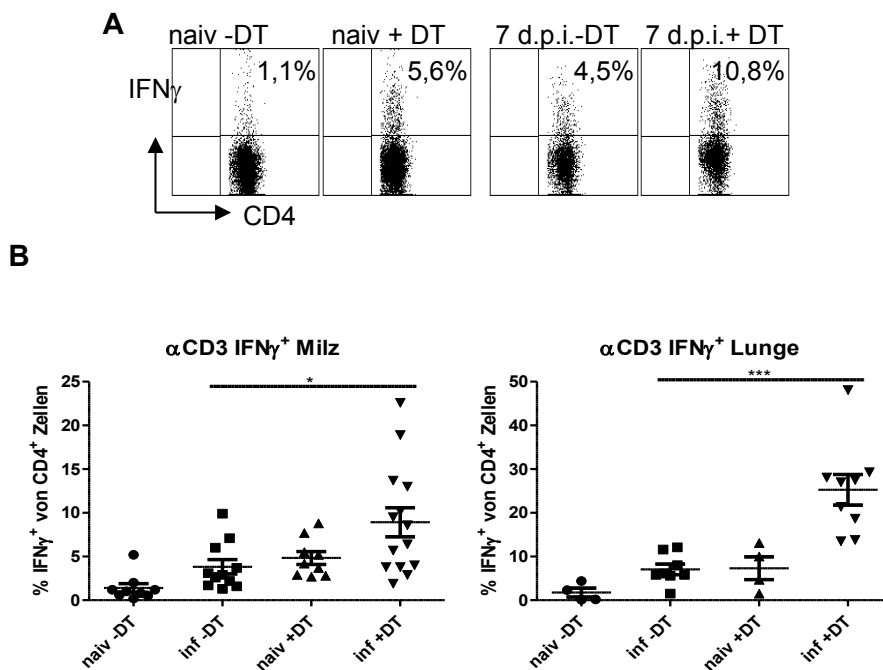


Abbildung 3.13: Erhöhte Anzahl IFN γ -produzierender CD4 $^{+}$ T-Zellen in Treg-depletierten Mäusen 7 d.p.i. Bei nicht infizierten (naiv -DT), Treg-depletierten (naiv +DT) und mit 5×10^4 PFU mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) i.p. infizierten (inf -DT) und Treg-depletierten Mäuse (inf +DT) wurden 7 d.p.i. die Lymphozyten aus der Milz und der Lunge isoliert. Sie wurden *in vitro* für 4,5 h in Anwesenheit von α CD3 (0,5 μ g/ml), IL-2 (0,1 u/ml) und Brefeldin A (10 μ g/ml) stimuliert. Der prozentuale Anteil IFN γ -produzierender Zellen an CD4 $^{+}$ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch analysiert. Dot Plots sind exemplarisch für CD4 $^{+}$ T-Zellen isoliert aus der Milz gezeigt (A). Zusammengefasste Daten aus drei unabhängigen Experimenten mit n= 1-3 pro Experiment (B). Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (* p< 0,05, *** p< 0,001).

Auch in der CD8 $^{+}$ T-Zellpopulation konnte ein signifikanter Anstieg an IFN γ -produzierenden Zellen in Treg-depletierten infizierten Mäusen im Vergleich zu infizierten unbehandelten Tieren nach Stimulation des T-Zellrezeptors mit einem α CD3-Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 3.14, B linke Spalte). Dieser Unterschied war wie bereits innerhalb des

CD4⁺ T-Zellpools bei den Zellen, die aus den Lungen isoliert wurden, stärker zu erkennen als bei den Zellen, die aus den Milzen isoliert worden waren (vgl. Abb. 3.13).

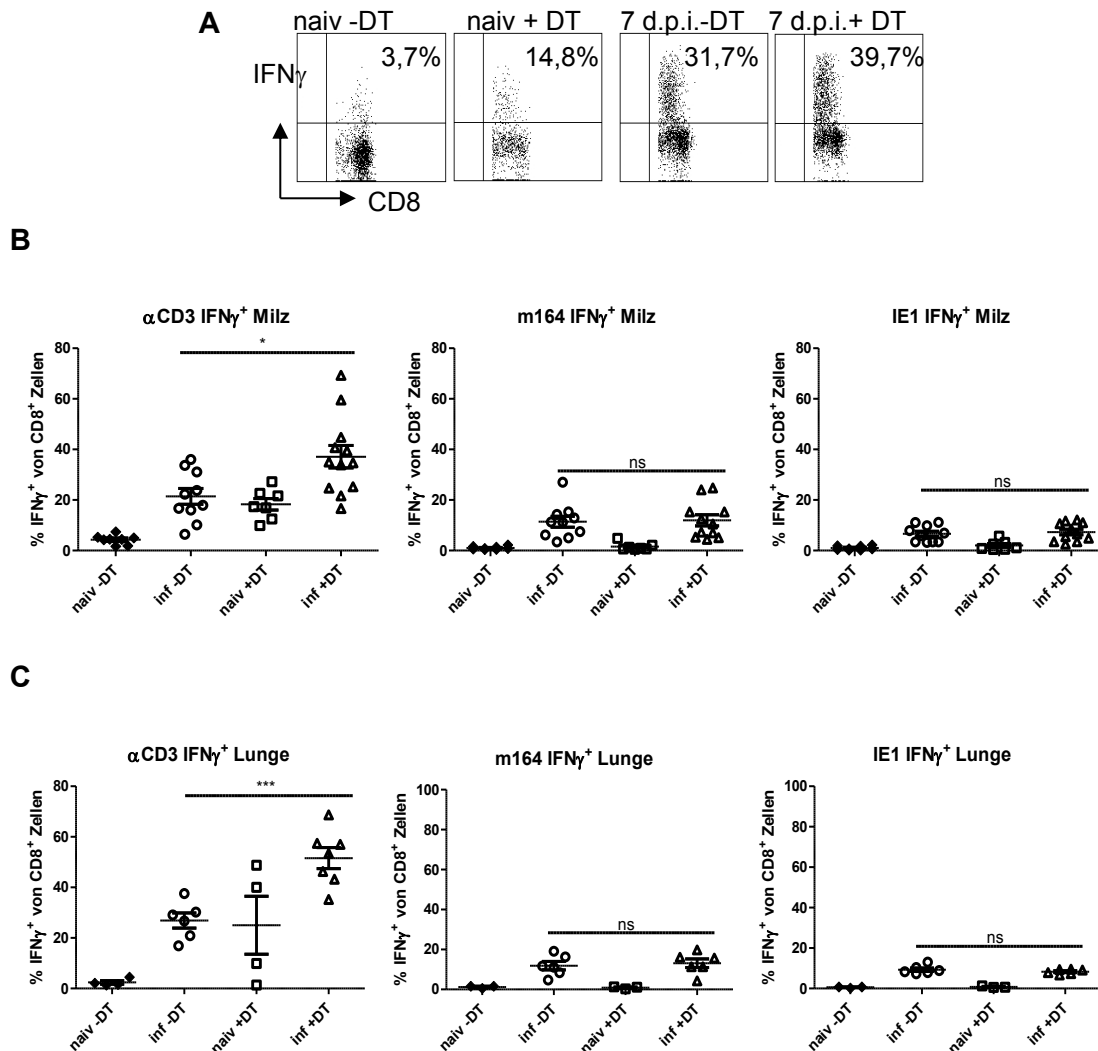


Abbildung 3.14: Anteil IFN γ -produzierender CD8⁺ T-Zellen in Treg-depletierten Mäusen 7 d.p.i. Sieben Tage nach Infektion von DEREK-Mäusen mit 5×10^4 PFU mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) und Depletion von Foxp3⁺ T-Zellen (DT-Gabe (30 ng DT/ mg Körpergewicht gelöst in PBS) i.p. an Tag -1, 1 und 3) wurden die Lymphozyten aus der Milz und der Lunge isoliert und *in vitro* für 4,5 h in Anwesenheit von α CD3 (0,5 μ g/ ml), IL-2 (0,1 u/ ml) und Brefeldin A (10 μ g/ ml) stimuliert. Um antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen zu messen wurde α CD3 in zwei weiteren Ansätzen durch die MHC-I restringierten mCMV-spezifischen Peptide m164 und IE1 ersetzt. Anschließend wurde der prozentuale Anteil IFN γ -produzierender Zellen an CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Dot Plots sind exemplarisch für CD8⁺ T-Zellen isoliert aus der Milz gezeigt (A). Zusammengefasste Daten aus zwei bis drei unabhängigen Experimenten mit n= 1-3 pro Experiment der Milz (B) und der Lunge (C). Zur Kontrolle wurden naive und Treg-depletierte naive DEREK-Mäuse gemessen. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (ns= nicht signifikant, * p< 0,05, *** p< 0,001).

Zusätzlich zur Gesamtpopulation waren auch antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen – spezifisch für die Antigene IE1 und m164 – durch Zugabe der entsprechenden antigenen Peptide restimuliert und analysiert worden. Allerdings zeigte sich weder in der Milz noch in der Lunge

eine Veränderung in der Abundanz der antigenspezifischen IFN γ -produzierenden CD8⁺ T-Zellen nach der Depletion regulatorischer T-Zellen in mCMV-infizierten Tieren (Abb. 3.14, A und B mittlere und linke Spalte). Bei der akuten mCMV-Infektion handelt es sich um eine systemische Infektion mit einer viralen Replikation in Epithelzellen vieler Organe. Daher wurde überprüft, ob die Depletion von Tregs auch einen Effekt auf den IFN γ Serumspegel hatte. Zu diesem Zweck wurden von infizierten Mäusen und infizierten Treg-defizienten Mäusen Blutserumproben entnommen und mit der Luminex-Technologie die Menge an IFN γ bestimmt. In Abbildung 3.15 ist das Ergebnis der Untersuchung graphisch dargestellt. In den nicht infizierten unbehandelten Mäusen war kein und in den nicht infizierten depletierten Mäusen waren nur geringe Mengen IFN γ nachzuweisen. In infizierten Treg-kompetenten Tieren hingegen ist IFN γ im Serum nachzuweisen. Dieser Spiegel ist in den infizierten Treg-depletierten Mäusen um ca. das zwei- siebenfache erhöht (Abb. 3.15).

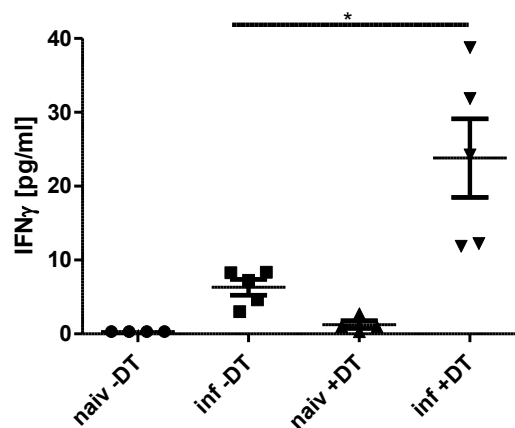


Abbildung 3.15: Erhöhte IFN γ -Serumspiegel in Treg-depletierten Mäusen während der akuten mCMV-Infektion. Nicht infizierte (naiv -DT), Treg-depletierte (naive +DT) und mit 5×10^4 PFU mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) i.p. infizierte (inf -DT) und Treg-depletierte Mäuse (inf +DT) wurden an Tag 7 nach Infektion analysiert. Der IFN γ -Spiegel im Blutserum wurde über die Luminex-Technologie gemessen. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier (n= 1-3 pro Experiment, gezeigt sind die zusammengefassten Daten aus zwei unabhängigen Versuchen). Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (* p< 0,05).

Neben der T-Zellantwort, die Teil der adaptiven Immunantwort ist, sind auch NK-Zellen, als Teil der angeborenen Immunantwort, während der akuten Phase der mCMV-Infektion an der Abwehr des Pathogens beteiligt. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Depletion regulatorischer T-Zellen die Immunantwort der NK-Zellen beeinflusst. Dazu wurden NK-Zellen aus der Milz, der Lunge und den Speicheldrüsen isoliert und der Anteil GzmB exprimierender Zellen bestimmt (Abb. 3.16). GzmB ist auch bei NK-Zellen ein Effektormolekül, welches während viraler Infektionen verstärkt exprimiert wird. Während der akuten mCMV-Infektion konnte ein erhöhter Anteil an GzmB-exprimierenden NK-Zellen nachgewiesen werden. Dies war sowohl in der Milz und der Lunge, als auch in den Speicheldrüsen zu erkennen (Abb. 3.16). Auch die Depletion von regulatorischen T-Zellen

führte in naiven Mäusen zu einer Zunahme an GzmB-exprimierenden NK-Zellen in der Milz und der Lunge (Abb. 3.16, linke und mittlere Spalte).

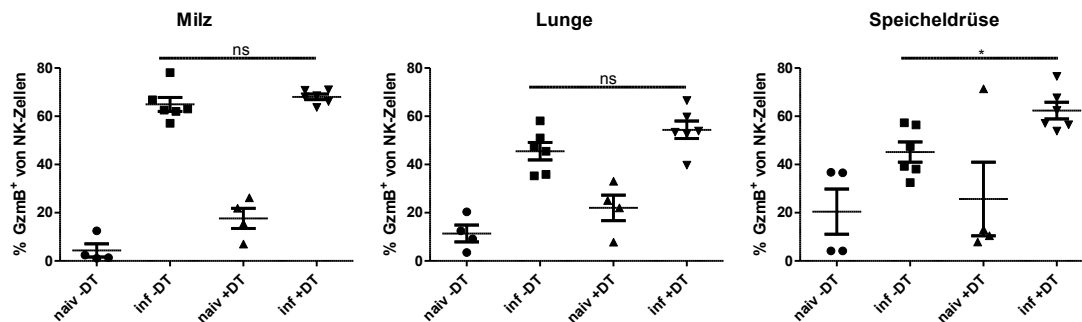


Abbildung 3.16: GzmB-exprimierende NK-Zellen während der akuten mCMV-Infektion nach Treg-Depletion. DEREK-Mäuse wurden mit 5×10^4 PFU mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) i.p. infiziert und $CD4^+ Foxp3^+$ T-Zellen depletiert. Nach 7 Tagen Infektion wurden die Lymphozyten aus der Milz, Lunge und den Speicheldrüsen isoliert. Der Anteil GzmB exprimierender NK-Zellen wurde über den Marker CD335, für NK-Zellen, und einem spezifischen monoklonalen Antikörper gegen GzmB durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle wurden naive und Treg-depletierte naive DEREK-Mäuse gemessen. Jeder Datenpunkt zeigt ein Versuchstier ($n = 1-3$ pro Experiment, gezeigt sind die zusammengefassten Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten). Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (ns= nicht signifikant, * $p < 0,05$).

Zwischen der infizierten unbehandelten und infizierten Treg-depletierten Gruppe ließ sich in den beiden Organen kein Unterschied in der Abundanz der Zellpopulation erkennen. In den Speicheldrüsen kam es hingegen zu einer leichten Erhöhung des prozentualen Anteils an GzmB-exprimierenden NK-Zellen (Abb. 3.16, rechte Spalte).

Neben des Phänotyps der Immunantwort ist der Einfluss regulatorischer T-Zellen auf die Effektivität der Immunantwort von entscheidender Bedeutung. Um dies zu überprüfen, wurde ein Plaque-Assay von Organhomogenaten der Lunge und der Speicheldrüsen durchgeführt und die Viruslast in den Organen bestimmt. Wie in Abbildung 3.17 gezeigt, führte die Depletion regulatorischer T-Zellen zu einer verminderten Viruslast in den Speicheldrüsen (rechte Spalte). Auch in der Lunge ist eine Verminderung an replizierendem Virus nachzuweisen, allerdings sind die Werte statistisch nicht signifikant (Abb. 3.17, linke Spalte).

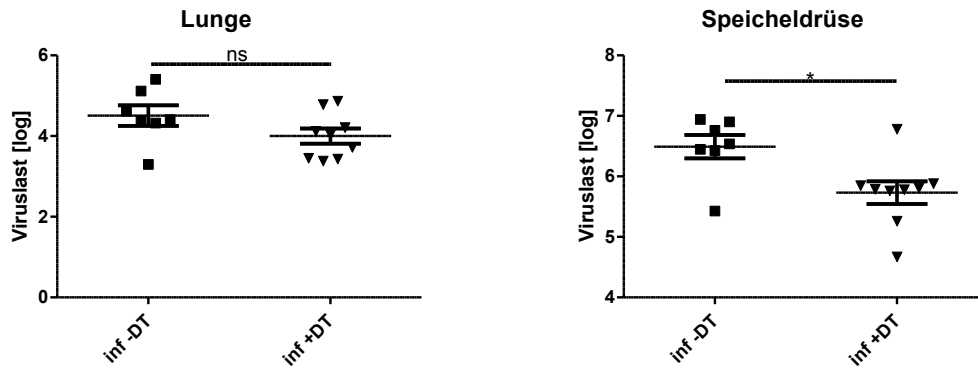


Abbildung 3.17: Viruslast in der Lunge und den Speicheldrüsen nach Treg-Depletion 7 d.p.i. DEREK Mäuse wurden mit 5×10^4 PFU mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) i.p. infiziert. An Tag -1, 1 und 3 wurden durch DT-Gabe Foxp3^+ T-Zellen in den Mäusen depletiert. 7 d.p.i. wurden die Lungen (A) und Speicheldrüsen (B) aus Foxp3-GFP Mäusen entnommen und mittels Plaque Assay die Viruslast ermittelt (n= 2-3, gezeigt sind die zusammengefassten Daten aus drei individuellen Experimenten). Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (ns= nicht signifikant, * $p < 0,05$).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Depletion regulatorischer T-Zellen zu einem erhöhten Aktivierungsstatus von T-Zellen in der Milz führte. Zusätzlich war ein erhöhter Anteil an GzmB- und sowohl in der Milz, als auch an $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden T-Zellen in der Lunge von infizierten Mäusen nachzuweisen. Allerdings traf dies nicht für die Population der antigenspezifischen $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden CD8^+ T-Zellen in Milz und Lunge zu. Auch in den Speicheldrüsen war ein Effekt auf den Aktivierungsstatus der T-Zellen nicht zu erkennen. Die Depletion von Tregs führte in der NK-Zellpopulation zu keinem Anstieg an GzmB- produzierenden Zellen in der Milz und der Lunge. In der Speicheldrüse hingegen war ein leichter Anstieg nachweisbar. Letztlich führte die Depletion der Tregs zu einer Verminderung der Viruslast in den Speicheldrüsen.

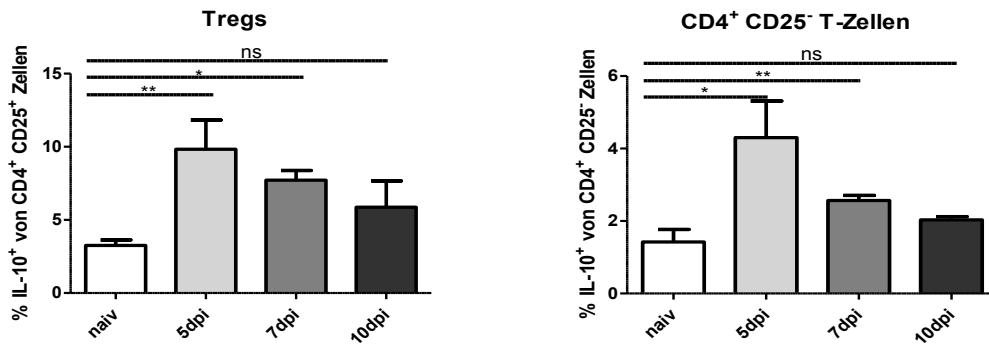
3.3 Interleukin 10 Expression während der akuten mCMV-Infektion

Das anti-inflammatorische Zytokin Interleukin 10 (IL-10) hat einen großen Einfluss auf die adaptive Immunantwort während akuter mCMV-Infektionen (Oakley et al., 2008). Darüber hinaus ist gezeigt worden, dass die Expression von IL-10 einen Suppressionsmechanismus regulatorischer T-Zellen darstellt (Rubtsov et al., 2008). Daher sollte im Folgenden die Expression von IL-10 in verschiedenen Zellpopulationen des Immunsystems nach mCMV-Infektion untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden IL-10-GFP Mäuse mit 5×10^4 PFU mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) i.p. infiziert. Diese transgene Mauslinie exprimiert eGFP unter der Kontrolle des IL-10-Promotors. Daher ist eine durchflusszytometrische Untersuchung der IL-10 Expression ohne intrazelluläre Färbung von IL-10 direkt über den Nachweis von GFP möglich.

Für die Analyse wurden im ersten Schritt $CD4^+$ T-Zellen untersucht. Diese wurden in die zwei Populationen $CD4^+ CD25^-$ und $CD4^+ CD25^+$ aufgeteilt. Da die Population der $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen zum Großteil (>80 %) $Foxp3^+$ Tregs enthält, wird sie im Folgenden als Treg-Population betrachtet. Diese Abgrenzung ist notwendig, da eine intrazelluläre Färbung von $Foxp3$ zu einem Verlust des GFP-Signals führte (eigene Beobachtung).

In Abbildung 3.18 ist das Ergebnis der Untersuchung der IL-10-Expression in $CD4^+$ T-Zellen isoliert aus den Milzen (A) und Lungen (B) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion graphisch dargestellt. Innerhalb der Tregs der Milz kam es 5 d.p.i. zu einer Verdopplung des Anteils IL-10 exprimierender Zellen und er blieb auch 7 d.p.i. signifikant erhöht. An Tag 10 nach Infektion war der Anteil wieder auf dem Niveau naiver T-Zellen. In den $CD4^+ CD25^-$ T-Zellen war von Tag 5 bis Tag 7 p.i. ein signifikanter Anstieg IL-10⁺ Zellen zu erkennen. An Tag 10 nach Infektion war wie in den Tregs der Wert naiver Zellen wieder erreicht (Abb. 3.18, A). Auch in der Lunge war eine Expansion IL-10 exprimierender $CD4^+$ T-Zellen nachzuweisen. Im Vergleich zu den Zellen aus der Milz war der Effekt hier stärker (Abb. 3.18, A und B). So exprimierten an Tag 5 und 7 nach Infektion ungefähr dreimal soviel regulatorische T-Zellen IL-10 im Vergleich zu Zellen aus naiven Tieren. Auch hier ging dieser Wert an Tag 10 auf das Niveau ohne Infektion zurück (Abb. 3.18, B). Auch die $CD4^+ CD25^-$ T-Zellen exprimierten in der Lunge signifikant höhere Mengen an IL-10. Der Wert stieg bis Tag 7 kontinuierlich an und ging an Tag 10 p.i. wieder zurück. Im Gegensatz zu den regulatorischen T-Zellen war der Wert aber noch immer erhöht gegenüber Zellen aus naiven Geschwistertieren (Abb. 3.18, B).

A



B

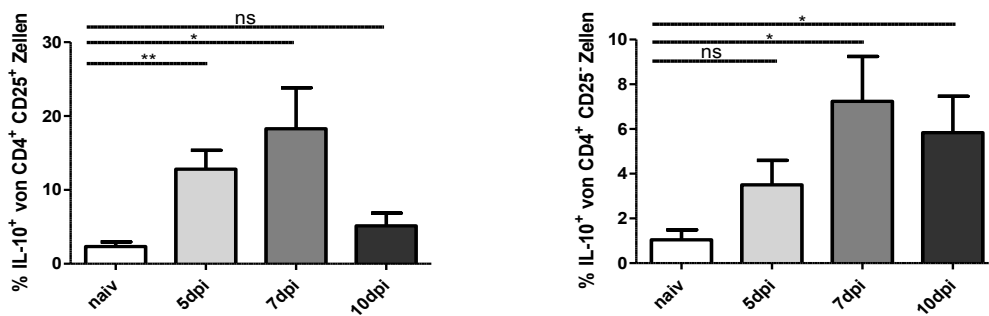


Abbildung 3.18: Expression von IL-10 während der akuten mCMV-Infektion in CD4⁺ T-Zellen. IL-10-GFP Mäuse wurden mit 5×10^4 PFU mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) i.p. infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Lymphozyten aus der Milz (A) und den Lungen (B) isoliert. Die IL-10-Expression wurde mittels FACS-Analyse der GFP-Expression in CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen und CD4⁺ CD25⁺ Treg-Zellen gemessen. Als Kontrolle wurden naive Geschwistertiere gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte der Ergebnisse aus 1-3 unabhängigen Experimenten mit $n = 1-3$ pro Experiment mit Standardfehler. Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (ns= nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Die Expression von IL-10 wurde zusätzlich über die Messung des IL-10 mRNA-Levels in Tregs und CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen untersucht. Hierzu wurden Foxp3-GFP Mäuse infiziert und an Tag 7 p.i. wurden die CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen und die CD4⁺ Foxp3⁻ Effektor-T-Zellen mittels FACS sortiert. Nach RNA-Isolation und reverser Transkription wurde die relative Expression des IL-10 Gens über eine Real-Time PCR Analyse bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.19 graphisch gezeigt. Die relative Genexpression war in Zellen – isoliert aus infizierten Tieren – sowohl in der Treg-, als auch in der Effektor-T-Zellpopulation erhöht. Die Expression hatte in beiden Populationen ungefähr einen zehnfach erhöhten Wert gegenüber Zellen, die aus nicht infizierten Geschwistertieren isoliert wurden (Abb. 3.19).

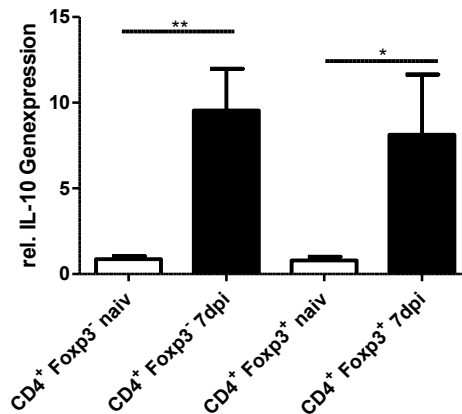
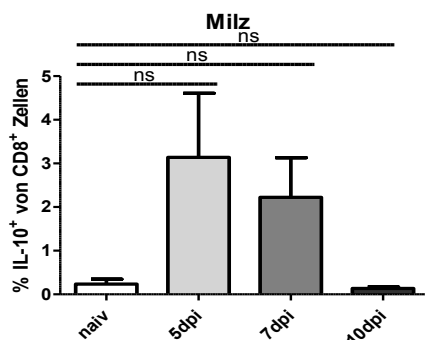


Abbildung 3.19: Erhöhte IL-10 Genexpression in CD4⁺ T-Zellen und Tregs 7 Tage nach mCMV-Infektion. Foxp3-GFP Mäuse wurden mit 5×10^4 PFU mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) i.p. infiziert. 7 d.p.i. wurden die CD4⁺ Foxp3⁻ und die CD4⁺ Foxp3⁺ T-Zellen isoliert und ihre mRNA aufgereinigt. Nach reverser Transkription wurde eine quantitative Real-Time PCR durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler von zwei unabhängigen Experimenten mit $n = 2-3$. Als Kontrolle wurden naive Geschwistertiere untersucht. Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Neben CD4⁺ T-Zellen sind auch IL-10 produzierende CD8⁺ T-Zellen Zellpopulationen mit immunsuppressiven Eigenschaften nachgewiesen worden (Noble et al., 2006). Daher wurde auch der prozentuale Anteil an IL-10 produzierenden Zellen innerhalb des CD8⁺ T-Zellpools isoliert aus der Milz und der Lunge nach mCMV Infektion bestimmt (Abb. 3.20, A und B).

A



B

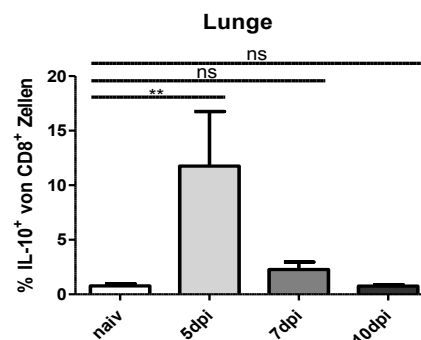


Abbildung 3.20: Expression von IL-10 während der akuten mCMV-Infektion in CD8⁺ T-Zellen. An Tag 5, 7 und 10 nach Infektion mit 5×10^4 PFU mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) i.p. wurden IL-10-GFP-Mäuse und als Kontrolle naive Geschwistertiere untersucht. Die Lymphozyten wurden aus der Milz (A) und der Lunge (B) isoliert und die Expression von IL-10 anhand der GFP-Expression in CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte der Ergebnisse aus 1-3 unabhängigen Experimenten mit $n = 1-3$ pro Experiment mit Standardfehler. Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (ns= nicht signifikant, ** $p < 0,01$).

Anders als bei den CD4⁺ T-Zellen gezeigt, exprimierte innerhalb der CD8⁺ T-Zellpopulation an Tag 5 der akuten mCMV-Infektion ein erhöhter Anteil IL-10 scheinbar nur in der Lunge. In der Milz hingegen war kein signifikanter Anstieg zu erkennen (Abb. 3.20, A und B). Der Anteil

an IL-10 exprimierenden CD8⁺ T-Zellen in der Lunge ging an Tag 7 p.i. stark zurück und lag an Tag 10 nach Infektion wieder auf dem Niveau von CD8⁺ T-Zellen aus naiven Geschwistertieren.

2011 konnten Stacey et al. in Mäusen mit genetischem C57BL/6 Hintergrund die Expansion IL-10 produzierender B-Zellen nachweisen (Stacey et al., 2011). Es sollte nun überprüft werden, ob auch es auch in Mäusen mit einem genetischen Balb/c Hintergrund zu dieser Expansion kommt. Nach durchflusszytometrischer Analyse konnte weder in naiven Mäusen noch in mCMV-infizierten Mäusen während der akuten Infektion in einem der untersuchten Organe eine erhöhte Expression von IL-10 in B-Zellen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind exemplarisch für die Milz in Abbildung 3.21 gezeigt.

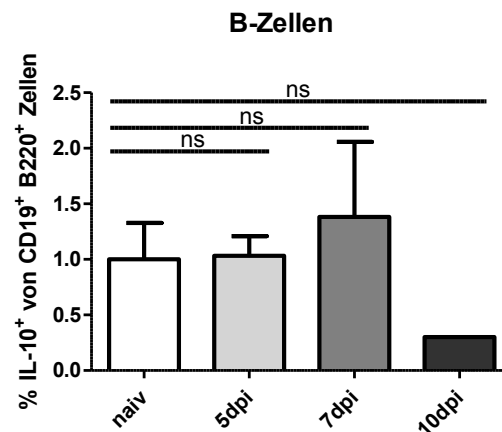


Abbildung 3.21: Expression von IL-10 während der akuten mCMV-Infektion in B-Zellen. An Tag 5, 7, 10 und 14 nach Infektion mit 5×10^4 PFU mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) i.p. wurden IL-10-GFP-Mäuse und als Kontrolle naive Geschwistertiere untersucht. Die Lymphozyten wurden aus der Milz isoliert und die Expression von IL-10 in B-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die B-Zellen wurden über ihre Oberflächenmarker CD19 und B220 bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte der Ergebnisse aus 1-3 unabhängigen Experimenten mit $n = 1-3$ pro Experiment mit Standardfehler. Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (ns= nicht signifikant, * $p < 0,05$).

Eine akute Infektion mit mCMV führte an Tag 5 und 7p.i. zu einer verstärkten Expression an IL-10 in T-Zellen. Hierbei produzierten besonders die CD4⁺ Effektor- und Treg-Zellen hohe Mengen an IL-10, sowohl in der Milz als auch in der Lunge. CD8⁺ T-Zellen exprimierten hingegen nur geringe Mengen an IL-10 in der Milz und etwas höhere Mengen in der Lunge. In den untersuchten B-Zellen konnte über den gemessenen Zeitraum keine erhöhte IL-10 Expression festgestellt werden. Innerhalb der Lymphozyten scheinen T-Zellen somit die Population der IL-10 produzierenden Zellen bei einer akuten mCMV-Infektion in Balb/c Mäusen zu sein.

3.4 Die T-Zellspezifische Inaktivierung der IL-10 Expression führt nach mCMV-Infektion zu einer Verringerung der Viruslast in den Speicheldrüsen

In den vorangegangenen Abschnitten ist gezeigt worden, dass eine Depletion von regulatorischen T-Zellen zu einer verstärkten T-Zellantwort führte (siehe Abschnitt 3.2). Weiterhin ist ein erhöhter Anteil IL-10 exprimierender T-Zellen während der akuten Phase der mCMV-Infektion nachgewiesen worden. Am stärksten war dies bei den CD4⁺ T-Zellpopulationen zu erkennen (Abb. 3.18 und 3.19).

Um den Einfluss von T-Zell-generiertem IL-10 *in vivo* zu untersuchen, wurden im Folgenden Mäuse der doppeltransgenen IL-10flx x CD4cre-Mauslinie mit mCMV infiziert. Diese Mauslinie ist eine Kreuzung der transgenen IL-10flx und der CD4cre Mauslinie und basiert auf dem „Cre/ LoxP-System“. Während in der IL-10flx-Mauslinie der Promotor und das Exon-1 des IL-10 Gens durch LoxP-Stellen flankiert ist, exprimiert die CD4cre-Mauslinie eine aktive Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des CD4-Promotors. In den doppeltransgenen Mäusen kommt es in der Folge zu einer T-Zellspezifischen Inaktivierung von IL-10 (Roers et al., 2004; Dissertation Simone Abel, 2011).

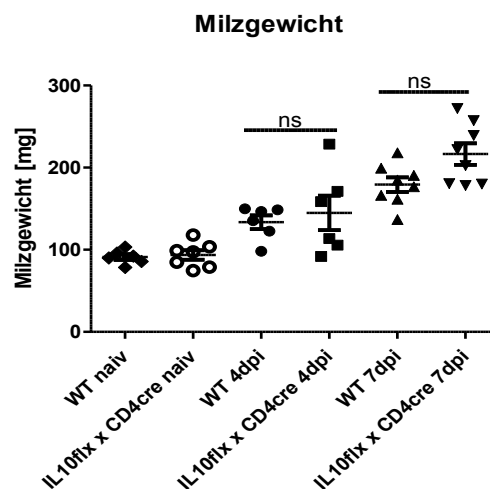
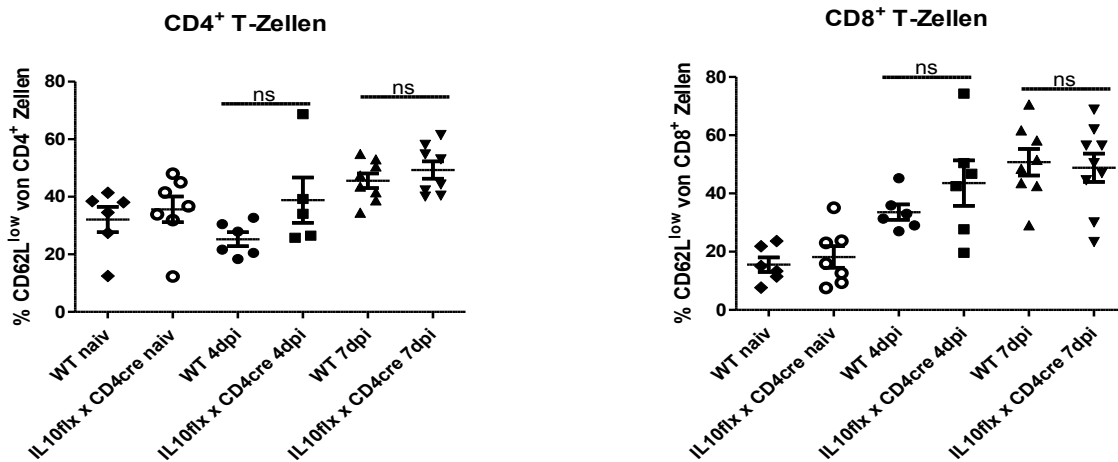


Abbildung 3.22: Milzgewichte nach T-Zellspezifischer IL-10-Inaktivierung bei akuter mCMV-Infektion. Wildtyp- und IL-10flx x CD4cre Mäuse wurden mit 5×10^4 PFU mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) i.p. infiziert. Nach 4 und 7 d.p.i. wurden die Milzgewichte bestimmt. Als Kontrolle wurden jeweils nicht-infizierte Geschwistertiere (IL-10^{flx/flx}, WT) gemessen. Dargestellt sind die zusammengefassten Ergebnisse aus mind. zwei unabhängigen Experimenten mit n=2-3 pro Experiment. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Statistische Analysen wurden mittels One-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni Test durchgeführt (ns= nicht signifikant).

Zunächst wurde das Milzgewicht der Mäuse nach Infektion untersucht. An Tag 4 p.i. ist bereits eine Gewichtszunahme der Milzen in IL10flx^{+/+} x CD4cre^{-/-} (Wildtyp, WT) und IL10flx^{+/+} x CD4cre^{+/-} (IL10flx x CD4cre) Mäusen nachweisbar. Allerdings war kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Nach sieben Tagen mCMV-Infektion hatte sich das

Gewicht weiter erhöht und es war ein Trend zu einem höheren Milzgewicht in den transgenen Mäusen zu erkennen. Die Daten sind aber statistisch nicht signifikant (Abb. 3.22).

A



B

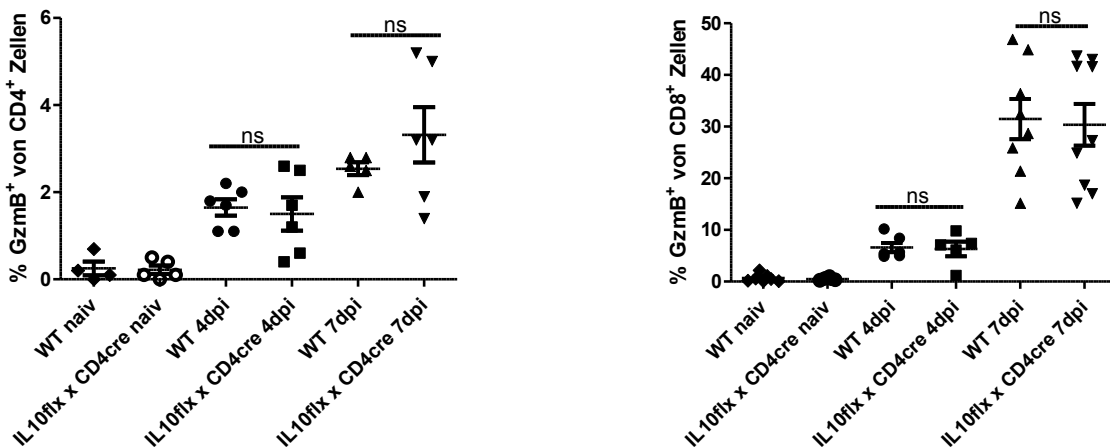
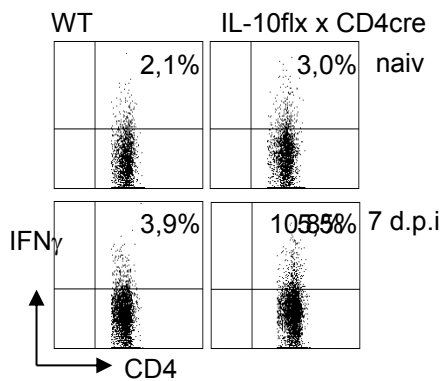


Abbildung 3.23: T-Zellaktivierungsstatus nach T-Zellspezifischer IL-10-Inaktivierung bei akuter mCMV-Infektion. Wildtyp- und IL-10flx x CD4cre Mäuse wurden mit 5×10^4 PFU mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) i.p. infiziert. Nach 4 und 7 d.p.i. wurden die Lymphozyten isoliert. Die CD62L-Expression (A) und die GzmB-Expression (B) der CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen wurden mittels FACS-Analyse gemessen. Als Kontrolle wurden jeweils nicht-infizierte Geschwistertiere (IL-10^{flx/flx}, WT) gemessen. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier (n= 2-3 von mindestens zwei individuellen Experimenten). Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (ns= nicht signifikant).

Als nächstes wurden aus den Milzen und den Lungen infizierter Mäuse Lymphozyten isoliert und der Phänotyp der T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Der Aktivierungsstatus der Zellen – gemessen über die Regulierung des Oberflächenmoleküls CD62L – zeigte zu den angegebenen Messzeitpunkten keinen Unterschied in den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zwischen WT und IL10flx x CD4cre Mäusen (Abb. 3.23, A). Die Expression des

Effektormoleküls GzmB war innerhalb der CD8⁺ T-Zellen in beiden Mauslinien sowohl in den WT, als auch in den doppeltransgenen Mäusen, identisch (Abb. 3.23, B, rechte Spalte). Die Analyse der CD4⁺ T-Zellen weist allerdings einen tendenziell erhöhten Anteil GzmB-exprimierender Zellen in den IL10flx x CD4cre Mäusen an Tag sieben nach Infektion auf (Abb. 3.23, B linke Spalte).

A



B

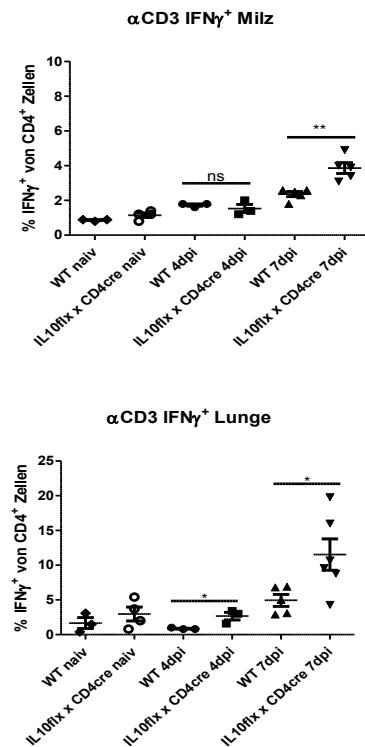
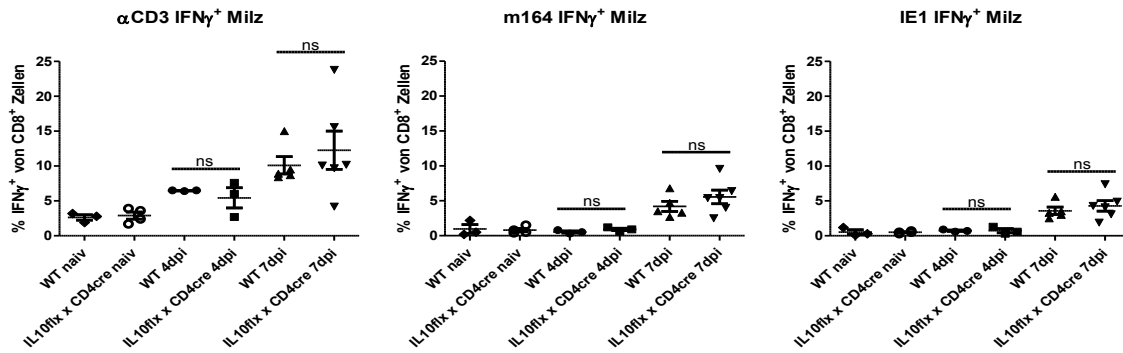


Abbildung 3.24: IFN γ -Expression in CD4⁺ T-Zellen nach T-Zellspezifischer IL-10-Inaktivierung bei akuter mCMV-Infektion. Wildtyp- und IL-10flx x CD4cre Mäuse wurden mit 5×10^4 PFU mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) i.p. infiziert. An den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurden die Lymphozyten aus der Milz und der Lunge isoliert. Die Zellen wurden *in vitro* für 4,5 h in Anwesenheit von α CD3 (0,5 μ g/ml), IL-2 (0,1 u/ml) und Brefeldin A (10 μ g/ml) stimuliert. Exemplarische Dot Plots der IFN γ -Expression in CD4⁺ T-Zellen (A). Als Kontrolle wurden jeweils nicht-infizierte Geschwistertiere (IL-10^{flx/flx}, WT) gemessen. Gezeigt sind die zusammengefassten Ergebnisse aus mind. zwei unabhängigen Experimenten (n= 2-3 pro Experiment). Die Datenpunkte stehen für jeweils ein Versuchstier. Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (ns= nicht signifikant, * p< 0,05, ** p< 0,01).

Wie bei den T-Zellen konnten auch bei den NK-Zellen zwischen den infizierten transgenen und den infizierten WT Mäusen in Bezug auf die GzmB Expression keine Unterschiede nachgewiesen werden. Ebenso zeigte die FACS-Analyse, dass der prozentuale Anteil CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorischer T-Zellen in beiden Gruppen identisch war (Daten nicht gezeigt). Wie in Abschnitt 1 gezeigt wird das Zytokin IFN γ während der akuten mCMV-Infektion in vielen T-Zellen exprimiert (siehe 3.1). Nach der Depletion Foxp3⁺ regulatorischer T-Zellen exprimierten besonders CD4⁺ T-Zellen verstärkt IFN γ . Daher sollten die CD4⁺ T-Zellen in den

IL10flx x CD4cre Mäusen detailliert untersucht werden. Die Zellen wurden dazu nach vier und sieben Tagen Infektion aus der Milz und den Lungen isoliert und restimuliert. 7 d.p.i. war in den CD4⁺ T-Zellen eine Erhöhung der IFN γ -produzierenden Zellen sowohl in der Milz als auch in der Lunge zu erkennen (Abb. 3.24).

A



B

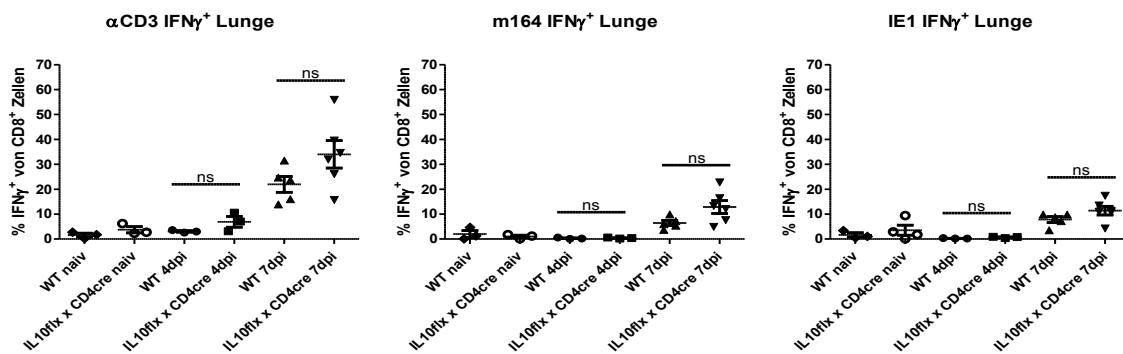


Abbildung 3.25: IFN γ -Expression in CD8⁺ T-Zellen nach T-Zellspezifischer IL-10-Inaktivierung bei akuter mCMV-Infektion. Wildtyp- und IL-10flx x CD4cre Mäuse wurden mit 5×10^4 PFU mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) i.p. infiziert. An den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurden die Lymphozyten aus der Milz und der Lunge isoliert. Die Zellen wurden *in vitro* für 4,5 h in Anwesenheit von α CD3 (0,5 μ g/ml), IL-2 (0,1 u/ml) und Brefeldin A (10 μ g/ml) stimuliert. Der prozentuale Anteil IFN γ -produzierender CD8⁺ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch analysiert. Um antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen in Milz (B) und Lunge (C) zu messen, wurde α CD3 in zwei weiteren Ansätzen durch die mCMV-spezifischen Peptide m164 oder IE1 (10 μ g/ml) ersetzt. Als Kontrolle wurden jeweils nicht-infizierte Geschwistertiere (IL-10^{flx/flx}, WT) gemessen. Die Datenpunkte stehen für jeweils ein Versuchstier. Dargestellt sind die zusammengefassten Ergebnisse aus mind. zwei unabhängigen Experimenten mit n= 2-3 pro Experiment. Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (ns= nicht signifikant).

In der CD8⁺ T-Zellpopulation war keine erhöhte Anzahl IFN γ -produzierender Zellen in den infizierten IL10flx x CD4cre im Vergleich zu den WT-Mäusen in den beiden Organen nachzuweisen (Abb. 3.25, A und B linke Spalte). Dies war sowohl bei den polyklonal stimulierten CD8⁺ T-Zellen, als auch in den mit den Peptiden m164 oder IE1 restimulierten antigenspezifischen Zellen zu erkennen (Abb. 3.25, A und B mittlere und rechte Spalte).

Letztlich wurde der Einfluss der T-Zellspezifischen Inaktivierung von IL-10 auf die Viruslast untersucht. Dazu wurde in der Lunge und den Speicheldrüsen die Menge an replizierendem Virus mittels Plaque Assay untersucht. In Abbildung 3.26 ist das Ergebnis der Untersuchung graphisch dargestellt. In der Lunge kam es zu einer tendenziellen Verringerung der Viruslast, die allerdings statistisch nicht signifikant war, in den Speicheldrüsen hingegen einen signifikanten Wert erreichte ($p < 0,05$).

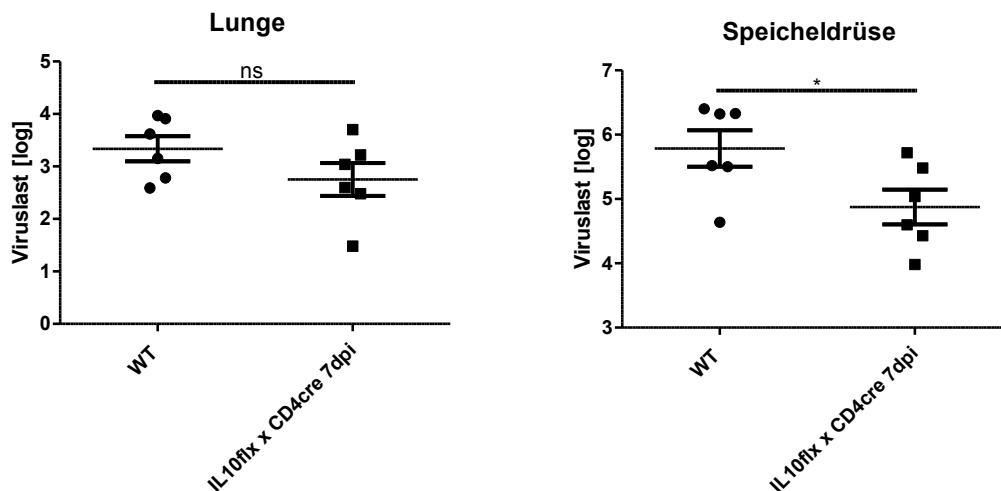


Abbildung 3.26: Viruslast während der akuten mCMV-Infektion bei Mäusen mit T-Zellspezifischer IL-10-Inaktivierung. IL-10flx x CD4cre Mäuse und WT Tiere (IL-10flx) wurden mit 5×10^4 PFU mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) i.p. infiziert. 7 d.p.i. wurde die Viruslast in der Lunge und den Speicheldrüsen mittels Plaque-Assay bestimmt. Dargestellt sind die zusammengefassten Ergebnisse aus mind. zwei unabhängigen Experimenten mit $n = 3$ pro Experiment. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Versuchstier. Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (ns= nicht signifikant, * $p < 0,05$).

1999 konnten Redpath et al. zeigen, dass die Expression von IL-10 in der akuten mCMV-Infektion zu einer Verringerung der MHC-II Expression auf Makrophagen führte (Redpath et al., 1999). Da für eine $CD4^+$ T-Zellantwort die Expression von MHC-II auf DCs wichtig ist, wurden $CD11c^+$ DCs 7 d.p.i. aus der Milz isoliert und die Menge an MHC-II durchflusszytometrisch bestimmt. In Abbildung 3.27 sind die Ergebnisse der Untersuchung graphisch dargestellt. Sieben Tage nach mCMV-Infektion kommt es zu einer Verringerung der MHC-II Expression auf den Milz-DCs aus den infizierten Versuchstieren im Vergleich zu den naiven Geschwistertieren. Allerdings war kein Unterschied zwischen dem IL-10flx x CD4cre Mausstamm und den Wildtypmäusen zu erkennen.

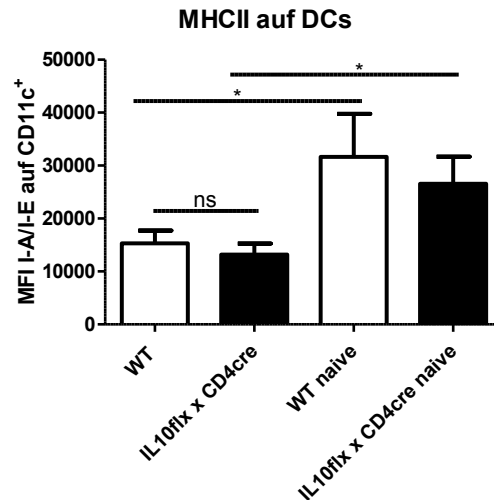


Abbildung 3.27: MHC-II Expression auf DCs während der akuten mCMV-Infektion nach T-Zellspezifischer IL-10 Inaktivierung. Wildtyp- und IL-10flx x CD4cre Mäuse wurden mit 5×10^4 PFU mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) i.p. infiziert. 7 d.p.i. wurden sie getötet und die Lymphozyten wurden aus der Milz isoliert. DCs wurden über das Oberflächenmolekül CD11c bestimmt. Die Expression an MHC-II (I-A/I-E) wurde durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind die zusammengefassten Daten von zwei individuellen Experimenten ($n=2-3$). Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (ns= nicht signifikant, * $p < 0,05$).

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass eine IL-10 Inaktivierung spezifisch in T-Zellen nicht zu einer signifikanten Verringerung des Oberflächenmoleküls CD62L auf den Zellen führte. $CD4^+$ T-Zellen hingegen weisen einen erhöhten Anteil IFN γ -produzierender Zellen in der Milz und besonders in der Lunge auf. Die IL-10 Deletion hatte keinen Einfluss auf die Expression von MHC-II auf DCs. Jedoch kam es zu einer signifikant verminderten Viruslast in den Speicheldrüsen der infizierten IL10flx x CD4cre-Mäuse im Vergleich zu infizierten WT-Mäusen.

3.5 Die Treg-spezifische Inaktivierung von IL-10 hat keinen Einfluss auf die Viruslast während der akuten mCMV-Infektion

Im vorhergehenden Abschnitt ist durch die T-Zellspezifische Inaktivierung von IL-10 in den IL10flx x CD4cre Mäusen ein Effekt auf die Expression von IFN γ und eine Verringerung der Viruslast in den Speicheldrüsen gezeigt worden. Im Folgenden sollte nun der Effekt einer spezifischen IL-10-Inaktivierung in CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen untersucht werden. Dazu wurde die bereits unter 3.4 beschriebene IL10flx-Mauslinie mit der transgenen FIC-Mauslinie verpaart. Mäuse der FIC („Fox-IRES-Cre“-)Linie exprimieren die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Foxp3-Promotors. Durch die Kreuzung der beiden transgenen Mauslinien wird IL-10 in allen Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen spezifisch inaktiviert. In den folgenden Experimenten werden FIC^{+/+} x IL10flx^{+/+} als FIC x IL10flx- und FIC^{-/-} x IL10flx^{+/+} als Wildtyp- (WT-) Mäuse bezeichnet.

Zunächst sollte überprüft werden, ob es in den transgenen Mäusen wirklich zu einer Inaktivierung des IL-10 Gens kommt. Dazu wurden WT und FIC x IL10flx Mäuse mit mCMV infiziert. An Tag 7 p.i. wurden CD4⁺ CD25⁻ Effektorzellen und CD4⁺ CD25⁺ regulatorische T-Zellen mittels Zellsortierung isoliert und die mRNA präpariert. Die mRNA wurde anschließend in cDNA umgeschrieben und es wurde eine PCR mit spezifischen Primern für IL-10 durchgeführt.

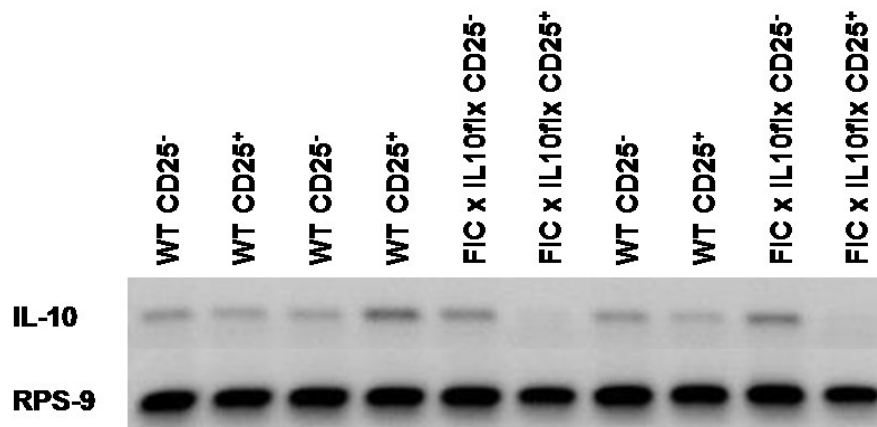
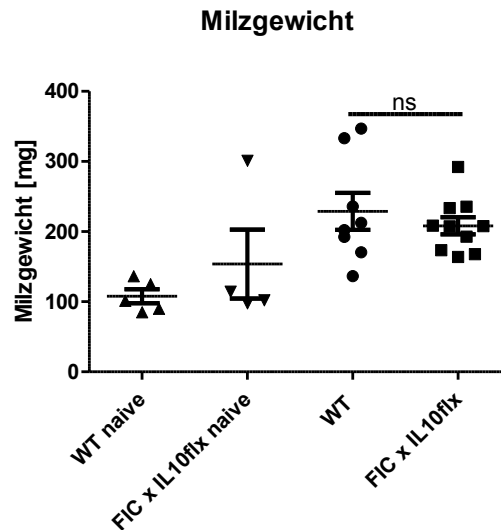


Abbildung 3.28: Treg-spezifische Inaktivierung von IL-10. WT (IL10flx) und IL-10flx x FIC Mäuse wurden mit 5×10^4 PFU mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) i.p. infiziert. 7 d.p.i. wurden CD4⁺ CD25⁻ Effektorzellen und CD4⁺ CD25⁺ Tregs isoliert, die mRNA isoliert und in cDNA transkribiert. Mit spezifischen Primern wurde in den Proben ein Fragment des IL-10 Gens und als Kontrolle ein Fragment des RPS-9 Gens amplifiziert.

In Abbildung 3.28 ist das Ergebnis gezeigt. Man erkennt, dass in allen Proben der Wildtypmäuse, sowie in den CD25⁻ Proben der FIC x IL10flx Mäusen ein IL-10 PCR-Produkt nachzuweisen war, im Gegensatz zu den CD25⁺ (Treg) Proben der FIC x IL10flx Mäuse. Um

Unterschiede durch den Einsatz unterschiedlicher Mengen an cDNA auszuschließen, wurde zur Kontrolle die Expression des Haushaltsgens RPS-9 mittels PCR untersucht. Somit konnte gezeigt werden, dass es in FIC x IL10flx Mäusen zu einer spezifischen Inhibition der IL-10 Expression in Tregs kommt.

A



B

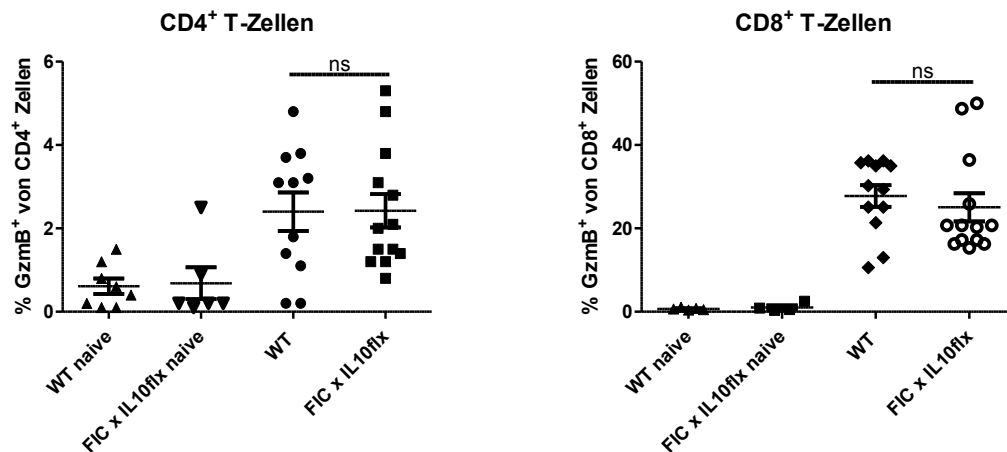
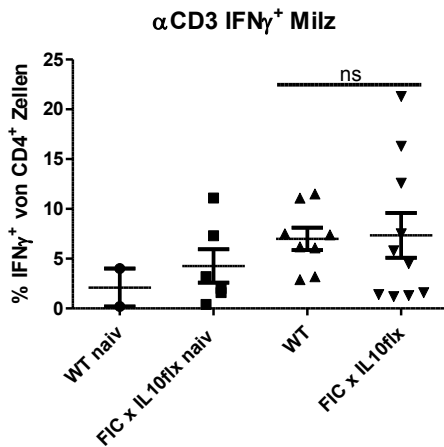


Abbildung 3.29: Milzgewichte und GzmB-Expression nach Treg-spezifischer IL-10-Inaktivierung bei akuter mCMV-Infektion. WT (IL-10flx) und IL-10flx x FIC Mäuse wurden mit 5×10^4 PFU mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) i.p. infiziert. Nach sieben Tagen wurden die Milzgewichte bestimmt (A) und die Lymphozyten aus der Milz isoliert. Der Anteil GzmB-exprimierender CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch analysiert. Ein Datenpunkt repräsentiert jeweils ein individuelles Versuchstier. Dargestellt sind die zusammengefassten Ergebnisse aus mind. zwei unabhängigen Experimenten mit n= 2-3 pro Experiment. Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (ns= nicht signifikant).

Sieben Tage nach mCMV-Infektion wurde in den FIC x IL10flx und WT-Geschwistertieren das Milzgewicht ermittelt. Wie in Abbildung 3.29 (A) zu erkennen, kam es nach Infektion zu einer Gewichtszunahme, welche in beiden Mausgruppen allerdings gleich ausfiel. Die weitere Untersuchung der T-Zellen isoliert aus den Milzen und Lungen zeigte keine Unterschiede hinsichtlich der CD62L Expression (Daten nicht gezeigt). Auch der Anteil GzmB-exprimierender CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen war in den doppeltransgenen Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen gleich (Abb. 3.29, B). Bei der Untersuchung der T-Zellen zeigte sich nach Treg-spezifischer IL-10 Depletion keine signifikante Erhöhung der IFN γ -Produktion (Abb. 3.30). Dies steht im Gegensatz zu der IL-10 Inaktivierung im gesamten T-Zellpool, wo es zu einer Erhöhung der IFN γ -Produktion in CD4⁺ T-Zellen kam (vgl. Abb. 3.24).

A



B

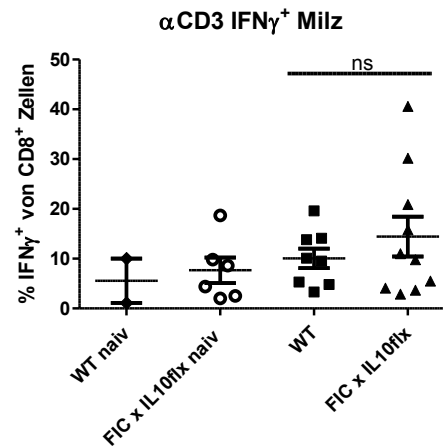


Abbildung 3.30: IFN γ -Expression nach Treg-spezifischer IL-10-Inaktivierung bei akuter mCMV-Infektion. WT (IL-10flx) und IL-10flx x FIC Mäuse wurden mit 5×10^4 PFU mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) i.p. infiziert. Sieben Tage p.i. wurden die Lymphozyten aus der Milz isoliert. Die Zellen wurden *in vitro* für 4,5 h in Anwesenheit von α CD3 (0,5 μ g/ml), IL-2 (0,1 U/ml) und Brefeldin A (10 μ g/ml) stimuliert. Der prozentuale Anteil IFN γ -produzierender CD4⁺ (A) und CD8⁺ T-Zellen (B) wurde durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle wurden jeweils nicht-infizierte Geschwistertiere (IL-10^{flx/flx}; WT) gemessen. Die Datenpunkte stehen für jeweils ein Versuchstier. Dargestellt sind die zusammengefassten Ergebnisse aus mind. zwei unabhängigen Experimenten mit n=2-3 pro Experiment. Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (ns= nicht signifikant).

Abschließend wurde die Viruslast in den infizierten Wildtyp- und FIC x IL-10flx Mäusen nach sieben Tagen mCMV-Infektion mittels Plaque-Assay bestimmt. Weder in der Lunge noch in den Speicheldrüsen war ein signifikanter Unterschied in der Menge an replikativen Virus zu erkennen (Abb. 3.31).

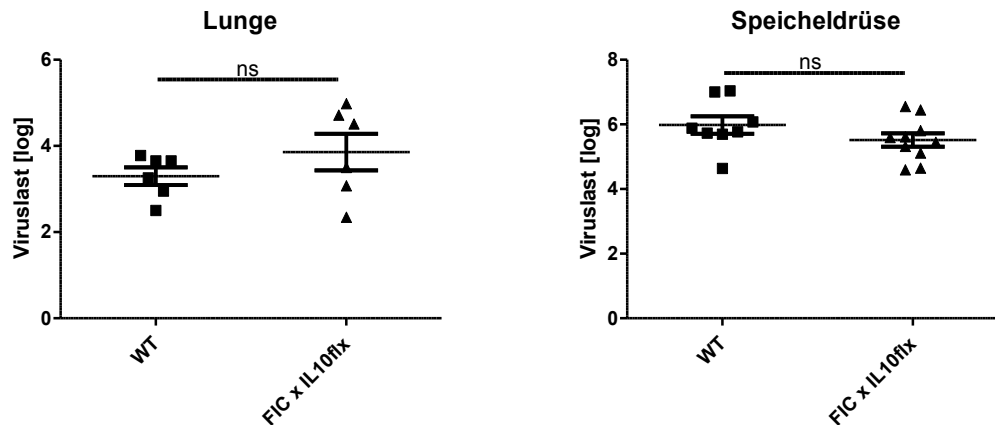


Abbildung 3.31: Viruslast während der akuten mCMV-Infektion bei Mäusen mit Treg-spezifischer IL-10-Inaktivierung. WT- (IL10flx) und IL-10flx x FIC Mäuse wurden mit mCMV Smith strain (ATCC VR-1399) 5×10^4 PFU i.p. infiziert. Nach sieben Tagen wurde die Viruslast in der Lunge und den Speicheldrüsen mit einem Plaque Assay bestimmt. Ein Datenpunkt steht für ein individuelles Versuchstier ($n=3$, aus zwei unabhängigen Versuchen). Statistische Analysen wurden mittels t-Test durchgeführt (ns= nicht signifikant).

Die Inaktivierung von IL-10 spezifisch in regulatorischen T-Zellen hatte somit keinen Einfluss auf die Expression der Effektormoleküle GzmB und IFN γ in CD4 $^+$ und CD8 $^+$ T-Zellen (vgl. Abb. 3.29 und 3.30). Zusätzlich kam es zu keiner Verringerung der Viruslast in der Lunge und den Speicheldrüsen im FIC x IL10flx Mausstamm im Vergleich zu Wildtypmäusen an Tag sieben nach mCMV-Infektion (vgl. Abb. 3.31).

4 Diskussion

Eine klinisch bedeutsame Eigenschaft von Cytomegalieviren (CMV) ist die Ausbildung latenter Infektionen in ihrem Wirt. In immunkompetenten Personen ist die Immunantwort stark genug, die Infektion nahezu asymptomatisch zu bekämpfen, aber zeitgleich zu schwach, um die Etablierung des latenten Stadiums des Virus zu unterbinden. Während einer Immunsuppression des Organismus, bspw. durch eine Infektion mit HIV, oder durch eine Immunsuppressionstherapie im Vorfeld einer Transplantation, kann es zu einer Reaktivierung des Virus kommen, die eine lebensbedrohliche Infektion auslöst. Auch eine Erstinfektion immunsupprimierter Patienten, sowie die kongenitale Infektion von Föten kann zu schwerwiegenden bis tödlichen Infektionen führen. In den letzten Jahrzehnten sind einige Mechanismen entdeckt worden über die CMV die Immunantwort durch den Wirtsorganismus unterdrückt. Bisher scheinen aber nicht alle immunmodulatorischen Mechanismen von CMV beschrieben zu sein, und eine effektive Therapie einer Infektion oder eine prophylaktische Vakzinierung sind bisher nicht verfügbar. Daher ist es wichtig, neue Mechanismen zu charakterisieren und deren Modulation im Hinblick auf einen therapeutischen Nutzen zu untersuchen.

Regulatorische T-Zellen (Tregs) haben die wichtige Funktion die Integrität des Organismus aufrecht zu erhalten. Sie unterdrücken die Aktivität autoreaktiver T-Zellen und verhindern so die Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie Diabetes und Multipler Sklerose (Sakaguchi et al., 2001; Chen et al., 1994). Darüber hinaus ist in den letzten Jahren in mehreren Studien ein Einfluss von Tregs auf die Ausbildung von chronischen Infektionen beschrieben worden. Dabei scheint dieser Mechanismus von verschiedenen Arten von Pathogenen ausgenutzt zu werden. So ist eine Beteiligung von Tregs während Leishmania-, aber auch bei Infektionen mit Viren wie HIV und Influenza beschrieben worden (Belkaid et al., 2002; Aandahl et al., 2004; Brincks et al., 2013). Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss und Phänotyp regulatorischer T-Zellen während der CMV-Infektion zu untersuchen. Eine solche Analyse ist in Patienten nur schwer möglich, da eine akute hCMV-Erstinfektion häufig asymptomatisch verläuft und eine spezifische Modulation regulatorischer T-Zellen in Anzahl und Funktion im Menschen zum jetzigen Zeitpunkt nicht vertretbar ist. Daher wurde das sehr gut beschriebene Tiermodell der Mausinfektion mit mCMV, auch im Hinblick auf den Einsatz transgener Mausmodelle, genutzt.

Grundlage für die Charakterisierung von Tregs ist die detaillierte Analyse der T-Zellantwort im Verlauf der mCMV-Infektion. Dabei zeigte sich, dass bereits vier Tage nach Infektion in der Milz und der Lunge eine erste T-Zellantwort beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 3.1).

Messungen der Effektormoleküle IFN γ und GzmB in T-Zellen zeigten die höchste Expression in beiden Organen an Tag 7 nach Infektion bevor die Expression im weiteren Verlauf wieder das Niveau von T-Zellen aus nicht-infizierten Tieren erreichte (vgl. Abb. 3.2, 3.3 und 3.4).

Durch Untersuchungen von Holtappels et al. sind zwei MHC-I restringierte mCMV-spezifische Peptide, IE1 und m164, in Balb/c Mäusen identifiziert worden, so dass eine Analyse von antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellantworten möglich ist. In der akuten Phase der mCMV Infektion konnte eine massive Infiltration von m164- und IE1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in die Lunge festgestellt werden (Holtappels et al., 2002b). Diese Beobachtung konnten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen und zusätzlich auf die Milz und die Speicheldrüsen ausweiten (vgl. Abb. 3.4). Cavanaugh et al. konnten in den Speicheldrüsen ebenfalls eine Einwanderung von IE1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nachweisen (Cavanaugh et al., 2003).

Bereits vier Tage nach Infektion war replizierender Virus in der Lunge und den Speicheldrüsen nachweisbar (vgl. Abb. 3.5). Während die Viruslast in der Lunge nur geringfügig anstieg und an Tag 21 wieder zurückging, stieg sie in den Speicheldrüsen an Tag 7 sprunghaft an und verblieb auf einem hohen Niveau über den gesamten Messzeitraum, was auch in anderen Studien gezeigt werden konnte. So ist in diesem Organ auch nach Monaten noch replizierender Virus detektierbar, während er in anderen Organen nicht mehr nachweisbar ist (Campbell et al., 2008).

Im Gegensatz zu anderen Infektionen, wie Malaria oder Leishmania-Infektionen, konnte in dieser Arbeit kein Anstieg an regulatorischen T-Zellen während der akuten Phase der mCMV-Infektion nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.5) (Abel et al., 2012; Belkaid et al., 2002). Auch die Expression des Oberflächenmoleküls Neuropilin-1 (Nrp-1) zeigte auf Tregs isoliert aus mCMV-infizierten Mäusen keinen Unterschied im Vergleich zu Tregs aus naiven Geschwistertieren. Nrp-1 war zuvor als ein Rezeptor beschrieben worden, über den Tregs mit Dendritischen Zellen (engl.: *dendritic cell*, DC) interagieren und die Aktivierung von Effektor T-Zellen beeinflussen (Sarris et al., 2008). Ergebnisse verschiedener Arbeiten zeigten eine erhöhte Expression von Nrp-1 auf natürlichen Tregs im Vergleich zu induzierten Tregs (iTregs), weshalb Nrp-1 als Marker für die Unterscheidung der beiden Tregpopulationen diskutiert wird (Yadav et al., 2012; Weiss et al., 2012). 2012 konnten Hansen et al. zeigen, dass die Expression von Nrp-1 die Migration von Tregs in Richtung des angiogenen Wachstumsfaktors VEGF leitet (Hansen et al., 2012). mCMV breitet sich im Wirtsorganismus systemisch aus und eine Beteiligung von VEGF ist bisher nicht beschrieben worden, weshalb ein Einfluss von Nrp-1 auf Tregs während der mCMV-Infektion fraglich ist.

Dazu passend zeigte die mCMV-Infektion in Mäusen, deren Tregs kein Nrp-1 exprimierten, im Vergleich zu infizierten WT-Mäusen keinen Unterschied bei der Immunantwort und den Viruslasten in der Lunge und den Speicheldrüsen (Daten nicht gezeigt), so dass ein sehr geringer, falls überhaupt vorhandener, Einfluss der Nrp-1 vermittelten Migration von Tregs in der CMV Infektion anzunehmen ist.

Allerdings scheinen die Tregs während der akuten Phase der mCMV-Infektion an Tag sieben p.i. einen stärker aktivierten Phänotyp zu besitzen. Sie zeigten zu diesem Zeitpunkt eine erhöhte Expression an CD25, der α -Untereinheit des IL-2 Rezeptors (vgl. Abb. 3.5). CD25 wird als ein Marker für den Aktivierungsstatus regulatorischer T-Zellen angesehen und es wird diskutiert, dass die Induktion von CD25 essentiell für die inhibitorische Wirkung von Tregs ist (Corthay, 2009). *In vitro* Analysen zu den suppressiven Fähigkeiten der Tregs isoliert aus infizierten Mäusen zeigten allerdings keinen Unterschied zu Tregs isoliert aus naiven Mäusen (vgl. Abb. 3.8). Das Design dieser Analysen schließt allerdings einen Einfluss regulatorischer T-Zellen auf den Verlauf der mCMV-Infektionen *in vivo* nicht aus. So inhibieren Tregs Immunantworten zu unterschiedlichen Phasen der T-Zellaktivierung und auch ein Einfluss auf andere Zellen des Immunsystems ist möglich (Sojka et al., 2008). Außerdem könnten antigenspezifische T-Zellen durch antigenspezifische Tregs inhibiert werden. So konnten Brincks et al. vor kurzem antigenspezifische Tregs bei Influenza-Infektionen nachweisen (Brincks et al., 2013). Eine Untersuchung antigenspezifischer regulatorischer T-Zellen während der mCMV-Infektion im Balb/c Mausstamm ist bislang jedoch nicht durchführbar, da bisher keine MHC-II restringierte Epitope in dieser Mauslinie identifiziert werden konnten.

Daher wurden im folgenden Tregs *in vivo* mit Hilfe des transgenen DEREK-Mausmodells depletiert. DEREK-Mäuse tragen den Diphtherie-Toxin-Rezeptor unter der Kontrolle des Foxp3-Promotors. Durch die Injektion von Diphtherie-Toxin ist die Depletion von Tregs *in vivo* möglich (Lahl et al., 2007) (Abb. 3.10). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten einen fundamentalen Einfluss der regulatorischen T-Zellen auf die T-Zellantwort. Dabei kam es in der Milz zu einem Anstieg an stärker aktivierten GzmB- und IFN γ -exprimierenden T-Zellen im Vergleich zu nicht-depletierten infizierten Geschwistertieren (vgl. Abb. 3.11 und Abb. 3.12).

Besonders hervorzuheben ist hierbei der Anstieg an GzmB und IFN γ exprimierenden Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Zellpopulation im Vergleich zu Zellen aus infizierten Treg-kompetenten Geschwistertieren. Während zuvor CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) als die wichtigsten Effektorzellen während viraler Infektionen angesehen wurden, gibt es derzeit

eine steigende Anzahl an Untersuchungen, die zusätzlich einen großen Einfluss von CD4⁺ CTLs auf die Immunantwort beschreiben (Manzke et al., 2013), so dass in den letzten Jahren CD4⁺ Effektor-T-Zellen in den Fokus der Forschung gerückt sind. Besonders während viraler Infektionen sind viele direkte Effekte antiviraler CD4⁺ T-Zellen gezeigt worden, die über die Helferfunktion hinausgehen (zusammengefasst in Swain et al., 2012). Auch im Verlauf einer mCMV-Infektion sind CD4⁺ Effektor-T-Zellen nachgewiesen worden. So sind beispielsweise Virus-spezifische IL-17-produzierende CD4⁺ T-Zellen nach einer Infektion gefunden worden (Arens et al., 2008). Auch die Expression von IFN γ in CD4⁺ T-Zellen ist bei mCMV-Infektionen in den Speicheldrüsen gezeigt worden (Humphreys et al., 2007). Jeitziner et al. konnten kürzlich einen großen Einfluss IFN γ -produzierender antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen in transgenen C57BL/6 Mäusen nachweisen. Ein adoptiver Transfer dieser Zellen führte zu einer verminderten Viruslast (Jeitziner et al., 2013). Auch während der hCMV-Infektion scheinen IFN γ -produzierende CD4⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle zu spielen. So haben Patienten mit einer erhöhten Anzahl an hCMV-spezifischen IFN γ -produzierenden CD4⁺ T-Zellen weniger Symptome und können die akute Infektion schneller bekämpfen (Gamadia et al., 2003).

In dem in dieser Arbeit verwendeten Balb/c Mausstamm konnten ebenfalls IFN γ -produzierende CD4⁺ T-Zellen in der Milz und besonders in der Lunge nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.3). Die Expression von IFN γ in diesen Zellen scheint durch Tregs inhibiert zu werden, da die *in vivo* Depletion der Tregs zu einer starken Zunahme der IFN γ -exprimierenden Zellen in der CD4⁺ T-Zellpopulation führte (vgl. Abb. 3.13). Allerdings konnten im Gegensatz zu den Ergebnissen von Humphreys et al. in Balb/c Mäusen keine IFN γ -produzierenden CD4⁺ T-Zellen innerhalb des Messzeitraumes in den Speicheldrüsen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.3). Die Messung des IFN γ -Spiegels im Blutserum der infizierten Mäuse zeigte eine starke Erhöhung in Treg-depletierten Mäusen im Vergleich zu nicht-depletierten Mäusen (vgl. Abb. 3.15). Dies unterstreicht den Einfluss regulatorischer T-Zellen auf die antivirale Immunantwort während der akuten mCMV-Infektion.

Ein wichtiger Parameter, um den Effekt einer Treg-Depletion auf den Verlauf der CMV-Infektion zu untersuchen, ist die Viruslast in unterschiedlichen Organen. Die Messung der Viruslast in Treg-depletierten mCMV-infizierten Mäusen zeigte eine starke Verringerung in den Speicheldrüsen. In der Lunge war ebenfalls eine leichte Senkung der Viruslast zu erkennen, die allerdings statistisch nicht signifikant war (vgl. Abb. 3.17). Der Effekt in den Speicheldrüsen könnte durch die stärkere T-Zellantwort in der Milz und der Lunge erklärt werden. Die Speicheldrüsen werden erst im späteren Verlauf der mCMV-Infektion infiziert (Stoddart et al., 1994). Eine verstärkte Bekämpfung in den Organen der frühen Infektion

könnte zu einer geringeren Anzahl an Viruspartikeln führen, welche später die Speicheldrüsen infizieren. Diese Annahme wird durch die beobachtete geringere Viruslast in der Lunge unterstützt. Allerdings lässt sich ein Einfluss durch NK-Zellen nicht ausschließen. Durch die Depletion der Tregs wurde innerhalb der Speicheldrüsen ein leichter Anstieg an GzmB-exprimierender NK-Zellen gemessen und Untersuchungen, in denen NK-Zellen durch depletierende Antikörper entfernt wurden, zeigten eine Erhöhung der Viruslast innerhalb der Speicheldrüsen (Bukowski und Welsh, 1985; Polic et al., 1996).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die *in vivo* Depletion regulatorischer T-Zellen einen starken Einfluss auf den Verlauf der akuten mCMV-Infektion hatte, insbesondere durch die Manipulation der T-Zellantwort. Ein besonderer Einfluss war hierbei innerhalb der CD4⁺ T-Zellpopulation zu erkennen, was die wichtige Rolle dieser Zellen während viraler Infektionen unterstreicht.

Für die Entwicklung neuer Therapieansätze ist es wichtig, die zugrundeliegenden Mechanismen, die zu einer unzureichenden Immunantwort während der CMV-Infektion führen, zu verstehen. Dazu wurden im Vorfeld Microarray Genexpressionsanalysen von CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen isoliert aus infizierten Mäusen sieben Tage p.i. im Vergleich zu Tregs aus nicht-infizierten Mäusen durchgeführt. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede im Expressionsprofil bekannter Treg-Markerproteine (z. B. GITR, Lag-3, CTLA-4) ermittelt (Daten nicht gezeigt). Es wurde allerdings eine erhöhte Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 in Tregs isoliert aus infizierten Mäusen im Vergleich zu Tregs aus naiven Geschwistertieren gemessen.

Der Einfluss von IL-10 auf den Verlauf der Immunantwort konnte bereits in verschiedenen Infektionsmodellen nachgewiesen werden. IL-10 wirkt auf mehrere Zelltypen des Immunsystems suppressiv. So zeigten DCs in Anwesenheit von IL-10 eine verminderte Expression kostimulatorischer Moleküle auf ihrer Oberfläche, was zu einer verminderten Stimulation von T-Zellen führt. Neben DCs ist IL-10 auch in der Lage NK-Zellen, Makrophagen und T-Zellen zu beeinflussen. Zu den Zellen, die in der Lage sind IL-10 zu produzieren, gehören mehrere Subpopulationen von T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und DCs (zusammengefasst in Moore et al., 2001). Der wichtige Einfluss von IL-10 bei herpesviralen Infektionen zeigt sich auch dadurch, dass sowohl CMV, als auch Epstein-Barr Viren, ein humanes IL-10 Homolog in ihren Genomen kodieren (Moore et al., 1990; Kotenko et al., 2000). Im Balb/c Mausstamm konnten zuvor bereits erhöhte mRNA-Level des Zytokins IL-10 in den Speicheldrüsen nach 6 und 14 Tagen Infektion gemessen werden. In der Milz oder den Lymphknoten war dieser Effekt allerdings nicht erkennbar (Cavanaugh et al., 2003).

Eine komplette Depletion von IL-10 während der mCMV-Infektion führte allerdings zur Entstehung von Immunpathologien, weshalb eine Eingrenzung der Depletion auf verschiedene Zellpopulationen therapeutisch von Vorteil wäre (Gaddi et al., 2012).

Allerdings wird kontrovers diskutiert, welcher Zelltyp während der mCMV-Infektion IL-10 produziert, und ob die Wirkung von IL-10 abhängig vom produzierenden Zelltyp ist. Während Stacey et al., B-Zellen der Milz und B-Zellen und DCs der Lunge als die wichtigsten IL-10 Produzenten im Verlauf der CMV-Infektion beschreiben (Stacey et al., 2011), zeigen Expressionsanalysen im C57BL/6 Mausstamm eine erhöhte IL-10 Expression in CD4⁺ T-Zellen zusammen mit NK-Zellen der Lunge (Mandaric et al., 2012). In der Milz wurden hier myeloide DCs als dominante IL-10 Produzenten identifiziert (Mandaric et al., 2012) und in den Speicheldrüsen infizierter C57BL/6-Mäuse sind ebenfalls IL-10 exprimierende CD4⁺ T-Zellen identifiziert worden (Humphreys et al., 2007). Somit konnte bislang nicht abschließend geklärt werden, welche Zellen die Hauptquelle für IL-10 während der mCMV-Infektion darstellen. Dies könnte auf die unterschiedlichen Maus- und mCMV-Stämme, die in den Studien genutzt wurden, zurückzuführen sein.

Um detailliert zu untersuchen, welcher Zelltyp in der akuten mCMV-Infektion von BALB/c Mäusen erhöhte IL-10 Produktion aufweist, wurde die Expression von IL-10 in verschiedenen Zelltypen während der akuten mCMV-Infektion von IL10-GFP Reportermäusen durchflusszytometrisch in der Milz und der Lunge untersucht. Dabei zeigte sich keine erhöhte IL-10 Expression in B-Zellen, welches mit den Ergebnissen von Mandaric et al. übereinstimmt (vgl. Abb. 3.21) (Mandaric et al., 2012). Während Mandaric et al. keine IL-10 Expression in CD8⁺ T-Zellen in der Lunge an Tag fünf nach Infektion messen konnten, wurde in dieser Arbeit ein erhöhter Anteil IL-10 produzierender pulmonaler CD8⁺ T-Zellen zu diesem Zeitpunkt nachgewiesen (vgl. Abb. 3.20). Interessanterweise war die Expression von IL-10 innerhalb der T-Zellpopulationen im Vergleich zu anderen Immunzellpopulationen am höchsten (vgl. Abb. 3.21 und Daten nicht gezeigt). Besonders der Anteil innerhalb der CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen, welche zum Großteil regulatorische T-Zellen umfassen, war an Tag 5 und 7 nach Infektion besonders in der Lunge erhöht. Auch die CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen zeigten einen Anstieg an IL-10 exprimierenden Zellen (vgl. Abb. 3.18) in der frühen Phase der CMV-Infektion. Mittels Real-Time Analysen konnte diese Beobachtung auf Ebene der Genexpression in der Milz an Tag sieben nach Infektion bestätigt werden (vgl. Abb. 3.19).

CD4⁺ CD25⁻ IL-10-produzierenden T-Zellen scheinen ebenso wie CD4⁺ CD25⁺ Tregs immunsuppressive Eigenschaften zu besitzen. So konnten Hansen et al. CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁻ regulatorische T-Zellen identifizieren, die nach Stimulation mit ihrem Antigen *in vivo* große

Mengen an IL-10 produzieren und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* inhibitorische Fähigkeiten besitzen (Hansen et al., 2007). Darüber hinaus kommt es auch während einer *Plasmodium yoelii* Infektion zur Induktion von CD4⁺ CD25⁻ IL-10⁺ T-Zellen, die suppressives Potential besitzen (Abel et al., 2012).

Durch die spezifische Depletion von IL-10 in CD4⁺ T-Zellen (IL10flx x CD4cre), konnten Abel et al. einen direkten Einfluss auf den Verlauf der parasitären Infektion eindrucksvoll nachweisen (Abel et al., 2012). Dabei konnten sie eine verstärkte T-Zellantwort in IL10flx x CD4cre Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen nach Infektion zeigen, was aber nur einen geringen Effekt auf die Parasitämie hatte.

Das IL10flx x CD4cre Mausmodell bietet die Möglichkeit die Expression von IL-10 spezifisch in T-Zellen zu inaktivieren (Roers et al., 2004). Dabei wird das IL-10 Gen durch eingefügte LoxP-Bindestellen durch die Cre-Rekombinase, die unter der Kontrolle des CD4-Promotors steht, spezifisch inaktiviert. Es ist allerdings anzumerken, dass neben CD4⁺ T-Zellen auch CD8⁺ T-Zellen bei ihrer Entstehung im Thymus kurzzeitig CD4 exprimieren (doppelt-positives Stadium, siehe Murphy, 2011) und somit auch hier IL-10 spezifisch inaktiviert werden kann. Man muss in diesen Mäusen also von einer T-Zellspezifischen Inaktivierung von IL-10 ausgehen.

Um zu untersuchen, inwieweit die beobachtete Induktion der IL-10 Expression in T-Zellen in CMV-infizierten Mäusen einen Einfluss auf den Verlauf der Infektion und insbesondere die Ausbreitung des Virus hat, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit IL10flx x CD4cre Mäuse mit mCMV infiziert. Dabei zeigte sich, dass die Infektion der IL10flx x CD4cre Mäuse an Tag sieben nach Infektion zu einer verstärkten T-Zellantwort im Vergleich zu infizierten WT Mäusen führte. Hier ist besonders der Anteil der IFN γ -produzierenden CD4⁺ T-Zellen in den Lungen zu nennen. Wie bereits besprochen exprimieren besonders antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen große Mengen an IFN γ im Verlauf der akuten mCMV-Infektion. Ein adoptiver Transfer dieser Zellen führte zu einer geringeren Viruslast in der Lunge und der Milz (Jeitziner et al., 2013). Es ist hervorzuheben, dass es auch bei einer T-Zellspezifischen Inaktivierung von IL-10 zu einer verminderten Viruslast in den Speicheldrüsen kam, bei einem gleichzeitig erhöhten Anteil an IFN γ -produzierendem Anteil an CD4⁺ T-Zellen, wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen (Abb. 3.26). Bereits in vorangegangenen Untersuchungen sind in unterschiedlichen Organen verschiedene Einflüsse von IL-10 auf die Viruslast beschrieben worden. So bewirkte ein vollständiger IL-10 Gen-*knock-out* in der Milz eine Verringerung der Viruslast (Oakley et al., 2008), während er in der Leber keinen Einfluss auf die Viruslast, aber auf die Ausbildung von Immunpathologien hatte (Tang-Feldman et al.,

2011; Gaddi et al., 2012). In Langzeitstudien wurden 90 Tage nach Infektion geringere mCMV-Genomkopien in der Lunge festgestellt, während es nach 60 Tagen keinen Unterschied zwischen IL-10-KO und Wildtyp Mäusen zu geben scheint (Jones et al., 2010).

Vor kurzem sind im C57BL/6 Mausstamm mehrere MHC-II restringierte mCMV-Peptide identifiziert worden, mit denen antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen *ex vivo* stimuliert und deren Immunantwort auf diese Weise analysiert werden können (Arens et al., 2008). Weiterführende Studien zeigten, dass der Anteil an IFN γ -produzierenden antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen in der akuten Phase, zwischen Tag fünf und zehn, der mCMV-Infektion stark ansteigt. Die Autoren fanden keinen Unterschied in der Viruslast in der Lunge in CD4⁺ T-Zelldepletierten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen an Tag acht nach Infektion (Holtappels et al., 2002a). Wie bereits weiter oben beschrieben konnten Jeitziner et al. jedoch einen starken Einfluss antigenspezifischer IFN γ -produzierender CD4⁺ T-Zellen nachweisen (Jeitziner et al., 2013). Daher ist der Einfluss dieser Zellpopulation bisher nicht vollständig geklärt. Ob und in wie weit diese Zellpopulation durch immunsuppressive Mechanismen reguliert wird, ist bisher ebenfalls nur wenig untersucht worden. Humphreys et al. haben bei Untersuchungen in Speicheldrüsen von C57BL/6 Mäusen eine IL-10 Rezeptorabhängige Regulation beschrieben. Durch die Blockade des IL-10 Rezeptors mit Hilfe eines blockierenden Antikörpers konnten sie einen erhöhten Anteil an IFN γ -produzierenden CD4⁺ T-Zellen nachweisen (Humphreys et al., 2007). Die Autoren postulierten, dass die Quelle von IL-10 die CD4⁺ T-Zellen darstellen was auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden konnte. Darüber hinaus konnten wir erstmals zeigen dass die T-Zellspezifische Inaktivierung von IL-10 in der Lunge von mCMV-infizierten Tieren zu einem Anstieg an IFN γ -produzierenden CD4⁺ T-Zellen führte (vgl. Abb. 3.24). Im Weiteren hatte dieser Effekt Auswirkungen auf die Viruslast in den Speicheldrüsen (vgl. Abb. 3.26). Somit scheinen CD4⁺ T-Zellen durch die Induktion von IL-10 die IFN γ -Produktion in CD4⁺ T-Zellen zu beeinflussen. Ob sich die CD4⁺ T-Zellen dabei autokrin inhibieren oder ob es sich um verschiedene Untergruppen von CD4⁺ T-Zellen, beispielsweise regulatorische T_R1-Zellen, und IFN γ -produzierende CD4⁺ T-Zellen handelt, müsste in weiteren Experimenten untersucht werden.

Vor kurzem konnten Mandaric et al. zeigen, dass in C57BL/6 Mäusen in der Lunge CD4⁺ T-Zellen und NK-Zellen und in der Milz zusätzlich myeloide DCs die dominanten IL-10 produzierenden Zellen darstellen. In weiteren Untersuchungen haben sie gezeigt, dass eine Depletion von IL-10 in KO-Mäusen zu einer Inhibierung von DCs durch NK-Zellen führt, was zu einer verminderten Aktivierung mCMV-spezifischer CD4⁺ T-Zellen geführt hat (Mandaric et al., 2012). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass IL-10 aus CD4⁺ T-Zellen

für diese Beobachtung im Balb/c Mausstamm nicht essentiell ist, da hier die Depletion zu einer verstärkten CD4⁺ T-Zellantwort geführt hat (vgl.: Abb.3.24). Entgegen der inhibitorischen Eigenschaften hat IL-10 auf NK-Zellen eine aktivierende Wirkung. IL-10 unterbindet während einer mCMV-Infektion in NK-Zellen den sogenannten *activation induced cell death* (AICD; Aktivierungs-induzierter Zelltod) was zu einer verstärkten NK-Zellantwort führt (Stacey et al., 2011). Auch diese Beobachtung konnte in den IL10flx x CD4cre Mäusen in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die hier durchgeführten Experimente müssten allerdings im C57BL/6 Mausstamm wiederholt werden, um den unterschiedlichen genetischen Hintergrund der beiden Mausstämme als Ursache für die gegensätzlichen Ergebnisse ausschließen zu können.

An dieser Stelle kann nicht ausgeschlossen werden, dass ausschließlich die Depletion von IL-10 in CD4⁺ T-Zellen die in dieser Arbeit gezeigte verbesserte Immunantwort während der akuten mCMV-Infektion bewirkt. Wie bereits angesprochen exprimieren auch CD8⁺ T-Zellen an Tag fünf nach Infektion in den Lungen IL-10. Ein Einfluss auf NK-Zellen konnte in dieser Arbeit allerdings nicht beobachtet werden. Bei der Messung von GzmB-produzierenden NK-Zellen war kein Unterschied zwischen WT und IL10flx x CD4cre in der Milz, Lunge oder den Speicheldrüsen zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Humphreys et al. haben dies für die Speicheldrüsen bei ihren Experimenten mit einem blockierenden Antikörper gegen den IL-10 Rezeptor ebenfalls im C57BL/6 Mausstamm gezeigt (Humphreys et al., 2007).

Die vollständige Depletion von IL-10 führte in infizierten Mäusen zu einer verstärkten pro-inflammatorischen Immunantwort und zeitgleich zu einem stärkeren Krankheitsverlauf. Dies manifestierte sich in einem starken Gewichtsverlust und einer Immunpathologie in der Leber der infizierten IL-10 KO-Mäuse (Tang-Feldman et al., 2011). Es ist anzumerken, dass die T-Zellspezifische Inaktivierung in der vorliegenden Arbeit zu keiner Verhaltensänderung der Mäuse, die einen stärkeren Krankheitsverlauf vermuten ließe, geführt hat. Messungen des Gewichts über den Verlauf der akuten mCMV-Infektion zeigten ebenfalls keinerlei Unterschiede zwischen IL10flx x CD4cre und WT Mäusen (Daten nicht gezeigt). Somit führt eine vollständige Depletion von IL-10 zu einer verstärkten Immunantwort, allerdings auf Kosten von Immunpathologien, während eine spezifische IL-10 Depletion in T-Zellen, diese scheinbar verhindert ohne die Immunantwort zu behindern. Daher wären bei einem therapeutischen Ansatz in dem nur die Expression von IL-10 in T-Zellen behindert wird, weniger Nebenwirkungen zu erwarten, als bei einer vollständigen IL-10 Depletionstherapie.

Die bisher beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass eine Depletion von regulatorischen T-Zellen zu einer verbesserten T-Zellimmunantwort und zu einer verminderten Viruslast in den

Speicheldrüsen von mCMV-infizierten Mäusen führte. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Tregs zusammen mit $CD4^+ CD25^-$ T-Zellen verstärkt IL-10 während der akuten Phase der mCMV-Infektion produzierten. Eine T-Zellspezifische Inaktivierung von IL-10 führte ebenfalls zu einer verstärkten T-Zellantwort, wobei hier besonders die $CD4^+$ T-Zellantwort zu nennen ist, sowie ebenfalls zu einer Senkung der Viruslast in den Speicheldrüsen während der akuten mCMV-Infektion.

Ein wichtiger Parameter für die Generierung einer effektiven Immunantwort ist die Präsentation von Antigenen auf MHC-Komplexen. Es sind mehrere Mechanismen beschrieben worden über die mCMV die Expression von MHC-I Molekülen behindert und so die Aktivierung von $CD8^+$ T-Zellen unterbindet (del Val et al., 1992; Reusch et al., 1999; Kavanagh et al., 2001). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass während einer mCMV-Infektion die Induktion von IL-10 zu einer verringerten Expression von MHC-II Komplexen auf APCs führt, wobei die Quelle des IL-10s in dieser Studie nicht identifiziert wurde (Redpath et al., 1999). Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, führte die Depletion von IL-10 spezifisch in T-Zellen zu einer verbesserten $CD4^+$ T-Zellantwort (vgl. Abb. 3.24). In weiteren Experimenten wurde die Expression von MHC-II auf DCs während der mCMV-Infektion in IL-10flx x CD4cre Mäusen gemessen. Die Ergebnisse in Abbildung 3.27 zeigen, dass es zu einer Verringerung der MHC-II Menge auf der Oberfläche der DCs nach mCMV-Infektion kam. Allerdings war die Abnahme in IL10flx x CD4cre Mäusen gleich der in WT Mäusen. Daher kann dieser Mechanismus für die Regulation von $CD4^+$ T-Zellen durch IL-10⁺ Foxp3⁺ iTregs ausgeschlossen werden.

Eine verstärkte IL-10 Expression durch regulatorische T-Zellen ist bereits in mehreren Infektionskrankheiten beschrieben worden (Tenorio et al., 2011; Brincks et al., 2013). Abschließende Versuche sollten daher überprüfen, ob der Immunsuppression regulatorischer T-Zellen während der akuten mCMV-Infektion die Expression von IL-10 zu Grunde liegt. Um dies zu überprüfen, wurde das transgene Mausmodell FIC x IL10flx genutzt. In diesem Modell steht die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Foxp3-Promotors, was zu einer Treg-spezifischen Inaktivierung von IL-10 in den doppeltransgenen Mäusen führt. PCR-Untersuchungen zeigten die erfolgreiche Inaktivierung von IL-10 in den $CD25^+$ Treg-Zellen der FIC x IL10flx Mäuse, wohingegen in den $CD25^-$ Effektorzellen IL-10 weiterhin nachweisbar war (vgl. Abb. 3.28). Die Treg-spezifische Inaktivierung von IL-10 führte während der akuten mCMV-Infektion im Vergleich zu infizierten WT-Mäusen zu keiner verstärkten T-Zellantwort. Es konnten weder erhöhte Anteile an GzmB-produzierenden, noch IFN γ -produzierenden T-Zellen gemessen werden (vgl. Abb. 3.29 und 3.30). Auch eine Verminderung der Viruslast, wie zuvor bei den IL10flx x CD4cre Mausexperimenten

gesehen, konnte nicht nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.31). Somit scheint Treg-produziertes IL-10 keinen oder nur einen unzureichenden Einfluss auf den Verlauf der mCMV-Infektion zu haben. Inwieweit dies spezifisch für mCMV-Infektionen ist muss in zukünftigen Studien geklärt werden. Die nachgewiesene immunsuppressive Wirkung der Tregs scheint daher während der mCMV-Infektion durch andere Moleküle vermittelt zu werden. Die im Vorfeld durchgeführten Genexpressionsanalysen zeigten in den klassischen Treg-Markern keinen Unterschied in Tregs isoliert aus infizierten Mäusen im Vergleich zu Tregs isoliert aus naiven Mäusen. Allerdings fiel eine erhöhte Expression des Effektormoleküls GzmB in Tregs aus mCMV-infizierten Mäusen auf. Gondek et al. konnten 2005 nachweisen, dass Tregs aktiv in Effektorzellen durch die Expression von GzmB Apoptose auslösen können (Gondek et al., 2005). Somit könnte die Expression von GzmB in Tregs während der akuten mCMV-Infektion die T-Zellantwort unterdrücken. Diese Vermutung müsste in weiteren Experimenten untersucht werden. Es könnten zum Beispiel regulatorische T-Zellen aus GzmB-defizienten Mäusen oder WT-Mäusen in Treg-depletierte Mäuse transferiert werden. Bei einer anschließenden Infektion könnte der Einfluss von GzmB auf die immunsuppressiven Fähigkeiten von Tregs untersucht werden, ohne den protektiven Schutz durch die GzmB-Expression der Effektor T-Zellen zu beeinflussen.

Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass regulatorische T-Zellen einen starken Einfluss auf eine akute mCMV-Infektion in Balb/c Mäusen besitzen. Zusätzlich konnte die Expression von IL-10 spezifisch durch T-Zellen als ein immunsuppressiver Mechanismus identifiziert werden. Eine Depletion der IL-10-Expression spezifisch in Tregs zeigte hingegen keinen Einfluss auf den Verlauf der Infektion. Somit deuten die Ergebnisse dieser Arbeit auf zwei unterschiedliche immunsuppressive Mechanismen hin, die die Immunantwort während der akuten mCMV-Infektion beeinflussen. Nach der Depletion der Foxp3⁺ Tregs in der akuten mCMV-Infektion kam es zu einer verstärkten T-Zellantwort und einer Verringerung an replizierendem Virus in den Speicheldrüsen. Nach Inaktivierung von IL-10 spezifisch in T-Zellen wurde ebenfalls eine verringerte Viruslast in den Speicheldrüsen beobachtet, allerdings wurden hierbei Veränderungen in der Immunantwort hauptsächlich in CD4⁺ T-Zellen beobachtet. Dabei bleibt es offen, ob eine Verbindung aus beiden beschriebenen Mechanismen, nämlich Treg-Depletion und T-Zellspezifischer IL-10 Inaktivierung, zu einer Verstärkung der beobachteten Effekte führt.

Die hier gezeigten Ergebnisse geben neue Einsichten in die Funktion regulatorischer T-Zellen während der akuten mCMV-Infektion. Weitere Untersuchungen, besonders ein Transfer auf die humane CMV-Infektion würde neue Targets für Therapieansätze aufzeigen.

Wie Nguyen et al. zeigen konnten hat der adoptive Transfer von Tregs nach hämatopoetischer Zelltransplantation einen positiven Effekt. So konnten sie zeigen, dass Mäuse denen neben Effektor T-Zellen auch Tregs transferiert wurden eine verbesserte lymphatische Rekonstitution aufwiesen und darüber hinaus eine unter normalen Umständen tödlich verlaufende mCMV-Infektion überlebten. Sie schlussfolgerten, dass die Tregs die Auswirkungen der GvHD unterbunden haben (Nguyen et al., 2008). Somit ist die Untersuchung des Einflusses von Tregs und der zugrundeliegenden Mechanismen der immunsuppressiven Fähigkeiten während CMV-Infektionen auch entscheidend für die Entwicklung neuer Therapieansätze bei Transplantationspatienten.

5 Zusammenfassung

Cytomegalieviren etablieren in ihren Wirten latente Infektionen, die in immunkompetenten Personen bei Erstinfektion nur wenige Symptome auslösen. Bei Immunsuppression, wie sie beispielsweise bei HIV- oder Transplantationspatienten auftritt, kann eine Reaktivierung des latenten Virus erfolgen. Eine Reaktivierung oder auch eine Erstinfektion unter Immunsuppression führt zu lebensbedrohlichen systemischen Infektionen in Patienten. Im Laufe der Koevolution mit ihren Wirtsorganismen haben Cytomegalieviren verschiedene Mechanismen entwickelt mit denen sie die Immunantwort des Wirts unterdrücken können. Welche Rolle regulatorische T-Zellen (Tregs), für die in den letzten Jahren in mehreren Infektionskrankheiten ein immunsuppressiver Einfluss beschrieben wurde, in der mCMV-Infektion spielen, ist allerdings nicht endgültig verstanden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zum ersten Mal, dass Tregs in vivo die Immunantwort während der akuten mCMV-Infektion im Balb/c Mausstamm supprimieren. Zwar konnte im Verlauf der akuten Infektion in der Milz, Lunge und den Speicheldrüsen keine Erhöhung des Anteils an Tregs ermittelt werden, allerdings zeigten sie einen erhöhten Aktivierungsstatus, der über die Messung der Expression des Markermoleküls CD25 nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus führte die spezifische Depletion von Foxp3⁺ Tregs zu einer verstärkten Immunantwort und zu einer signifikanten Verringerung der Viruslast im Vergleich zu nicht-depletierten infizierten Geschwistertieren. Die verstärkte Immunantwort war besonders in den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulationen nachzuweisen. Dabei wurde jeweils ein erhöhter Anteil an GzmB- und IFN γ -produzierender Zellen gemessen.

Interessanterweise wurde bei Analysen von mCMV-infizierten IL-10-GFP Reportermäusen eine erhöhte Expression von IL-10 nicht nur in CD4⁺ CD25⁺ Tregs sondern auch in CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten Geschwistertieren gemessen. Die T-Zell-spezifische Inaktivierung von IL-10 in IL-10flx x CD4cre Mäusen führte innerhalb der CD4⁺ T-Zellen zu einem stark erhöhten Anteil an IFN γ -exprimierenden Zellen im Vergleich zu CD4⁺ T-Zellen aus infizierten WT-Mäusen, der mit einer signifikant verringerten Viruslast einherging. Die Treg-spezifische Inaktivierung von IL-10 hatte hingegen keinen Einfluss auf die Immunantwort und die Viruslast. Demzufolge scheinen verschiedene Populationen von Tregs, nämlich CD4⁺ Foxp3⁺ Tregs und CD4⁺ Foxp3⁻ IL-10⁺ Tregs, an der Immunsuppression während der akuten Phase der mCMV-Infektion beteiligt zu sein. Die gezeigten Daten weisen darauf hin, dass IL-10-produzierende CD4⁺ T-Zellen besonders auf CD4⁺ IFN γ -produzierende T-Zellen supprimierend wirken, während Foxp3⁺ Tregs zusätzlich CD8⁺ T-Zellen und zu einem geringen Maße auch NK-Zellen supprimieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit erweitern somit unsere Kenntnisse der immunsuppressiven Mechanismen, die zu

einer unzureichenden Immunantwort während der mCMV-Infektion führen. Sie könnten somit zur Entwicklung neuer Therapien basierend auf einer Modifikation von T-Zellantworten zur Bekämpfung einer akuten hCMV-Infektion beitragen.

6 Literatur

Aandahl, E. M., Michaelsson, J., Moretto, W. J., Hecht, F. M. und Nixon, D. F., "Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens," *Journal of virology*, 2004, 2454-9.

Abel, S., Luckheide, N., Westendorf, A. M., Geffers, R., Roers, A., Müller, W., Sparwasser, T., Matuschewski, K., Buer, J. und Hansen, W., "Strong impact of CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells and limited effect of T cell-derived IL-10 on pathogen clearance during *Plasmodium yoelii* infection," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2012, 5467-77.

Abel, S. „CD4⁺ T-Zell-vermittelte Immunregulation während der *Plasmodium yoelii*-Infektion“, Dissertation, *Universität Duisburg-Essen*, 2011

Alain, S., Honderlick, P., Grenet, D., Stern, M., Vadam, C., Sanson-Le Pors, M. J. und Mazon, M. C., "Failure of ganciclovir treatment associated with selection of a ganciclovir-resistant cytomegalovirus strain in a lung transplant recipient," *Transplantation*, 1997, 1533-6.

Andrews, D. M., Estcourt, M. J., Andoniou, C. E., Wikstrom, M. E., Khong, A., Voigt, V., Fleming, P., Tabarias, H., Hill, G. R., van der Most, R. G., Scalzo, A. A., Smyth, M. J. und Degli-Esposti, M. A., "Innate immunity defines the capacity of antiviral T cells to limit persistent infection," *The Journal of experimental medicine*, 2010, 1333-43.

Anz, D., Mueller, W., Golic, M., Kunz, W. G., Rapp, M., Koelzer, V. H., Ellermeier, J., Ellwart, J. W., Schnurr, M., Bourquin, C. und Endres, S., "CD103 is a hallmark of tumor-infiltrating regulatory T cells," *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 2011, 2417-26.

Arase, H., Mocarski, E. S., Campbell, A. E., Hill, A. B. und Lanier, L. L., "Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors," *Science (New York, N.Y.)*, 2002, 1323-6.

Arbones, M. L., Ord, D. C., Ley, K., Ratech, H., Maynard-Curry, C., Otten, G., Capon, D. J. und Tedder, T. F., "Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice," *Immunity*, 1994, 247-60.

Arens, R., Wang, P., Sidney, J., Loewendorf, A., Sette, A., Schoenberger, S. P., Peters, B. und Benedict, C. A., "Cutting edge: murine cytomegalovirus induces a polyfunctional CD4 T cell response," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2008, 6472-6.

Arvin, A. M., Fast, P., Myers, M., Plotkin, S. und Rabinovich, R., "Vaccine development to prevent cytomegalovirus disease: report from the National Vaccine Advisory Committee," *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2004, 233-9.

Aschan, J., Ringden, O., Ljungman, P., Lonnqvist, B. und Ohlman, S., "Foscarnet for treatment of cytomegalovirus infections in bone marrow transplant recipients," *Scandinavian journal of infectious diseases*, 1992, 143-50.

Babic, M., Pyzik, M., Zafirova, B., Mitrovic, M., Butorac, V., Lanier, L. L., Krmpotic, A., Vidal, S. M. und Jonjic, S., "Cytomegalovirus immunoevasin reveals the physiological role of "missing self" recognition in natural killer cell dependent virus control in vivo," *The Journal of experimental medicine*, 2010, 2663-73.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B. und Palucka, K., "Immunobiology of dendritic cells," *Annual review of immunology*, 2000, 767-811.

- Barber, D. L., Wherry, E. J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J. P., Sharpe, A. H., Freeman, G. J. und Ahm, R.,** "Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection," *Nature*, 2006, 682-7.
- Barry, M., Heibei, J. A., Pinkoski, M. J., Lee, S. F., Moyer, R. W., Green, D. R. und Bleackley, R. C.,** "Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid," *Molecular and cellular biology*, 2000, 3781-94.
- Barry, M. und Bleackley, R. C.,** "Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death," *Nature reviews. Immunology*, 2002, 401-9.
- Belkaid, Y., Piccirillo, C. A., Mendez, S., Shevach, E. M. und Sacks, D. L.,** "CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity," *Nature*, 2002, 502-7.
- Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., Kelly, T. E., Saulsbury, F. T., Chance, P. F. und Ochs, H. D.,** "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3," *Nature genetics*, 2001, 20-1.
- Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P. und Salazar-Mather, T. P.,** "Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines," *Annual review of immunology*, 1999, 189-220.
- Boeckh, M., Bowden, R. A., Goodrich, J. M., Pettinger, M. und Meyers, J. D.,** "Cytomegalovirus antigen detection in peripheral blood leukocytes after allogeneic marrow transplantation," *Blood*, 1992, 1358-64.
- Boeckh, M., Huang, M., Ferrenberg, J., Stevens-Ayers, T., Stensland, L., Nichols, W. G. und Corey, L.,** "Optimization of quantitative detection of cytomegalovirus DNA in plasma by real-time PCR," *Journal of clinical microbiology*, 2004, 1142-8.
- Bowden, R. A., Digel, J., Reed, E. C. und Meyers, J. D.,** "Immunosuppressive effects of ganciclovir on in vitro lymphocyte responses," *The Journal of infectious diseases*, 1987, 899-903.
- Bowen, E. F., Emery, V. C., Wilson, P., Johnson, M. A., Davey, C. C., Sabin, C. A., Farmer, D. und Griffiths, P. D.,** "Cytomegalovirus polymerase chain reaction viraemia in patients receiving ganciclovir maintenance therapy for retinitis," *AIDS (London, England)*, 1998, 605-11.
- Bregante, S., Bertilson, S., Tedone, E., Van Lint, M. T., Trespi, G., Mordini, N., Berisso, G., Gualandi, F., Lamparelli, T., Figari, O., Benvenuto, F., Raiola, A. M. und Bacigalupo, A.,** "Foscarnet prophylaxis of cytomegalovirus infections in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation (BMT): a dose-finding study," *Bone marrow transplantation*, 2000, 23-9.
- Brincks, E. L., Roberts, A. D., Cookenham, T., Sell, S., Kohlmeier, J. E., Blackman, M. A. und Woodland, D. L.,** "Antigen-specific memory regulatory CD4+Foxp3+ T cells control memory responses to influenza virus infection," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2013, 3438-46.
- Bruder, D., Probst-Keppler, M., Westendorf, A. M., Geffers, R., Beissert, S., Loser, K., von Boehmer, H., Buer, J. und Hansen, W.,** "Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells," *European journal of immunology*, 2004, 623-30.
- Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., Paepers, B., Clark, L. B., Yasayko, S. A., Wilkinson, J. E., Galas, D., Ziegler, S. F. und Ramsdell, F.,** "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse," *Nature genetics*, 2001, 68-73.

- Bukowski, J. F. und Welsh, R. M.**, "Inability of interferon to protect virus-infected cells against lysis by natural killer (NK) cells correlates with NK cell-mediated antiviral effects in vivo," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 1985, 3537-41.
- Campbell, A. E., Cavanaugh, V. J. und Slater, J. S.**, "The salivary glands as a privileged site of cytomegalovirus immune evasion and persistence," *Medical microbiology and immunology*, 2008, 205-13.
- Cao, X., Cai, S. F., Fehniger, T. A., Song, J., Collins, L. I., Piwnica-Worms, D. R. und Ley, T. J.**, "Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance," *Immunity*, 2007, 635-46.
- Cavanaugh, V. J., Deng, Y., Birkenbach, M. P., Slater, J. S. und Campbell, A. E.**, "Vigorous innate and virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses to murine cytomegalovirus in the submaxillary salivary gland," *Journal of virology*, 2003, 1703-17.
- Cheeran, M. C-J, Mutnal, M. B., Hu, S., Armien, A. und Lokensgard, J. R.**, "Reduced lymphocyte infiltration during cytomegalovirus brain infection of interleukin-10-deficient mice," *Journal of neurovirology*, 2009, 334-42.
- Chen, L. und Flies, D. B.**, "Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition," *Nature reviews. Immunology*, 2013, 227-42.
- Chen, Y., Kuchroo, V. K., Inobe, J., Hafler, D. A. und Weiner, H. L.**, "Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis," *Science (New York, N.Y.)*, 1994, 1237-40.
- Chen, Z. und O'Shea, J. J.**, "Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells," *Immunologic research*, 2008, 87-102.
- Cheng, G., Arima, M., Honda, K., Hirata, H., Eda, F., Yoshida, N., Fukushima, F., Ishii, Y. und Fukuda, T.**, "Anti-interleukin-9 antibody treatment inhibits airway inflammation and hyperreactivity in mouse asthma model," *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2002, 409-16.
- Collison, L. W., Chaturvedi, V., Henderson, A. L., Giacomini, P. R., Guy, C., Bankoti, J., Finkelstein, D., Forbes, K., Workman, C. J., Brown, S. A., Rehg, J. E., Jones, M. L., Ni, H., Artis, D., Turk, M. J. und Vignali, D. A. A.**, "IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population," *Nature immunology*, 2010, 1093-101.
- Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R. S. und Vignali, D. A. A.**, "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function," *Nature*, 2007, 566-9.
- Coombes, J. L., Robinson, N. J., Maloy, K. J., Uhlig, H. H. und Powrie, F.**, "Regulatory T cells and intestinal homeostasis," *Immunological reviews*, 2005, 184-94.
- Coombes, J. L., Siddiqui, K. R. R., Arancibia-Carcamo, C. V., Hall, J., Sun, C., Belkaid, Y. und Powrie, F.**, "A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism," *The Journal of experimental medicine*, 2007, 1757-64.
- Corthay, A.**, "How do regulatory T cells work?" *Scandinavian journal of immunology*, 2009, 326-36.
- Craig, J. M., Macauley, J. C., Weller, T. H. und Wirth, P.**, "Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease," *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 1957, 4-12.
- Creagh, E. M. und O'Neill, L. A. J.**, "TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity," *Trends in immunology*, 2006, 352-7.

- Curotto de Lafaille, M. A. und Lafaille, J. J.**, "Natural and adaptive foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?" *Immunity*, 2009, 626-35.
- Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J., Enjoji, K., Linden, J., Oukka, M., Kuchroo, V. K., Strom, T. B. und Robson, S. C.**, "Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression," *The Journal of experimental medicine*, 2007, 1257-65.
- del Val, M., Hengel, H., Hacker, H., Hartlaub, U., Ruppert, T., Lucin, P. und Koszinowski, U. H.**, "Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide-loaded major histocompatibility complex class I molecules into the medial-Golgi compartment," *The Journal of experimental medicine*, 1992, 729-38.
- Delale, T., Paquin, A., Asselin-Paturel, C., Dalod, M., Brizard, G., Bates, E. E. M., Kastner, P., Chan, S., Akira, S., Vicari, A., Biron, C. A., Trinchieri, G. und Briere, F.**, "MyD88-dependent and -independent murine cytomegalovirus sensing for IFN- α release and initiation of immune responses in vivo," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2005, 6723-32.
- Demangel, C., Bertolino, P. und Britton, W. J.**, "Autocrine IL-10 impairs dendritic cell (DC)-derived immune responses to mycobacterial infection by suppressing DC trafficking to draining lymph nodes and local IL-12 production," *European journal of immunology*, 2002, 994-1002.
- Depper, J. M., Leonard, W. J., Kronke, M., Noguchi, P. D., Cunningham, R. E., Waldmann, T. A. und Greene, W. C.**, "Regulation of interleukin 2 receptor expression: effects of phorbol diester, phospholipase C, and reexposure to lectin or antigen," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 1984, 3054-61.
- Dietze, K. K., Zelinskyy, G., Liu, J., Kretzmer, F., Schimmer, S. und Dittmer, U.**, "Combining Regulatory T Cell Depletion and Inhibitory Receptor Blockade Improves Reactivation of Exhausted Virus-Specific CD8⁺ T Cells and Efficiently Reduces Chronic Retroviral Loads," *PLoS Pathogens*, 2013,.
- Dunn, G. P., Old, L. J. und Schreiber, R. D.**, "The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting," *Immunity*, 2004, 137-48.
- Einsele, H., Hebart, H., Kauffmann-Schneider, C., Sinzger, C., Jahn, G., Bader, P., Klingebiel, T., Dietz, K., Löffler, J., Bokemeyer, C., Müller, C. A. und Kanz, L.**, "Risk factors for treatment failures in patients receiving PCR-based preemptive therapy for CMV infection," *Bone marrow transplantation*, 2000, 757-63.
- Eyerich, Stefanie, Eyerich, Kilian, Pennino, Davide, Carbone, Teresa, Nasorri, Francesca, Pallotta, Sabatino, Cianfarani, Francesca, Odorisio, Teresa, Traidl-Hoffmann, Claudia, Behrendt, Heidrun, Durham, Stephen R., Schmidt-Weber, Carsten B. und Cavani, Andrea**, "Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling," *The Journal of clinical investigation*, 2009, 3573-85.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K. W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Fioretti, M. C., Alegre, M. und Puccetti, P.**, "Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells," *Nature immunology*, 2003, 1206-12.
- Fiorentino, D. F., Bond, M. W. und Mosmann, T. R.**, "Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones," *The Journal of experimental medicine*, 1989, 2081-95.
- Fleischer, B.**, "Acquisition of specific cytotoxic activity by human T4⁺ T lymphocytes in culture," *Nature*, 1984, 365-7.
- Floess, S., Freyer, J., Siewert, C., Baron, U., Olek, S., Polansky, J., Schlawe, K., Chang, H., Bopp, T., Schmitt, E., Klein-Hessling, S., Serfling, E., Hamann, A. und Huehn, J.**, "Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells," *PLoS biology*, 2007, e38.

- Fontenot, J. D., Gavin, M. A. und Rudensky, A. Y.**, "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells," *Nature immunology*, 2003, 330-6.
- Frank, M. M. und Fries, L. F.**, "The role of complement in inflammation and phagocytosis," *Immunology today*, 1991, 322-6.
- Gabrysova, L., Nicolson, K. S., Streeter, H. B., Verhagen, J., Sabatos-Peyton, C. A., Morgan, D. J. und Wraith, D. C.**, "Negative feedback control of the autoimmune response through antigen-induced differentiation of IL-10-secreting Th1 cells," *The Journal of experimental medicine*, 2009, 1755-67.
- Gaddi, P. J., Crane, M. J., Kamanaka, M., Flavell, R. A., Yap, G. S. und Salazar-Mather, T. P.**, "IL-10 mediated regulation of liver inflammation during acute murine cytomegalovirus infection," *PloS one*, 2012, e42850.
- Gamadia, L. E., Remmerswaal, E. B. M., Weel, J. F., Bemelman, F., van Lier, R. A. W. und Ten Berge, I. J. M.**, "Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4+ T cells in protection against CMV disease," *Blood*, 2003, 2686-92.
- Garin, M. I., Chu, C., Golshayan, D., Cernuda-Morollon, E., Wait, R. und Lechler, R. I.**, "Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells," *Blood*, 2007, 2058-65.
- Gavin, M. A., Torgerson, T. R., Houston, E., DeRoos, P., Ho, W. Y., Stray-Pedersen, A., Ocheltree, E. L., Greenberg, P. D., Ochs, H. D. und Rudensky, A. Y.**, "Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 6659-64.
- Gazzinelli, R. T., Oswald, I. P., James, S. L. und Sher, A.**, "IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 1992, 1792-6.
- Gershon, R. K. und Kondo, K.**, "Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes," *Immunology*, 1970, 723-37.
- Gershon, R. K., Cohen, P., Hencin, R. und Liebhaver, S. A.**, "Suppressor T cells," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 1972, 586-90.
- Gleaves, C. A., Smith, T. F., Shuster, E. A. und Pearson, G. R.**, "Comparison of standard tube and shell vial cell culture techniques for the detection of cytomegalovirus in clinical specimens," *Journal of clinical microbiology*, 1985, 217-21.
- Gol-Ara, M., Jadidi-Niaragh, F., Sadria, R., Azizi, G. und Mirshafiey, A.**, "The Role of Different Subsets of Regulatory T Cells in Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis," *Arthritis*, 2012,.
- Gondek, D. C., Lu, L., Quezada, S. A., Sakaguchi, S. und Noelle, R. J.**, "Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2005, 1783-6.
- Goodrich, J. M., Mori, M., Gleaves, C. A., Du Mond, C., Cays, M., Ebeling, D. F., Buhles, W. C., DeArmond, B. und Meyers, J. D.**, "Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation," *The New England journal of medicine*, 1991, 1601-7.
- Gorelik, L., Constant, S. und Flavell, R. A.**, "Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation," *The Journal of experimental medicine*, 2002, 1499-505.
- Grawunder, U., West, R. B. und Lieber, M. R.**, "Antigen receptor gene rearrangement," *Current opinion in immunology*, 1998, 172-80.

- Grewal, I. S. und Flavell, R. A.,** "CD40 and CD154 in cell-mediated immunity," *Annual review of immunology*, 1998, 111-35.
- Grossman, W. J., Verbsky, J. W., Tollefsen, B. L., Kemper, C., Atkinson, J. P. und Ley, T. J.,** "Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells," *Blood*, 2004, 2840-8.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E. und Roncarolo, M. G.,** "A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis," *Nature*, 1997, 737-42.
- Grunig, G., Corry, D. B., Leach, M. W., Seymour, B. W., Kurup, V. P. und Rennick, D. M.,** "Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis," *The Journal of experimental medicine*, 1997, 1089-99.
- Hahn, G., Jores, R. und Mocarski, E. S.,** "Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 3937-42.
- Hansen, W., Hutzler, M., Abel, S., Alter, C., Stockmann, C., Kliche, St., Albert, J., Sparwasser, T., Sakaguchi, S., Westendorf, A. M., Schadendorf, D., Buer, J. und Helfrich, I.,** "Neuropilin 1 deficiency on CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells impairs mouse melanoma growth," *The Journal of experimental medicine*, 2012, 2001-16.
- Hansen, W., Westendorf, A. M., Reinwald, S., Bruder, D., Deppenmeier, S., Groebe, L., Probst-K., M., Gruber, A. D., Geffers, R. und Buer, J.,** "Chronic antigen stimulation in vivo induces a distinct population of antigen-specific Foxp3 CD25 regulatory T cells," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2007, 8059-68.
- Haribhai, D., Lin, W., Relland, L. M., Truong, N., Williams, C. B. und Chatila, T. A.,** "Regulatory T cells dynamically control the primary immune response to foreign antigen," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2007, 2961-72.
- Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M. und Weaver, C. T.,** "Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages," *Nature immunology*, 2005, 1123-32.
- Heath, V. L., Murphy, E. E., Crain, C., Tomlinson, M. G. und O'Garra, A.,** "TGF-beta1 down-regulates Th2 development and results in decreased IL-4-induced STAT6 activation and GATA-3 expression," *European journal of immunology*, 2000, 2639-49.
- Hengel, R. L., Thaker, V., Pavlick, M. V., Metcalf, J. A., Dennis, G., Yang, J., Lempicki, R. A., Sereti, I. und Lane, H. C.,** "Cutting edge: L-selectin (CD62L) expression distinguishes small resting memory CD4⁺ T cells that preferentially respond to recall antigen," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2003, 28-32.
- Holtappels, R., Podlech, J., Geginat, G., Steffens, H. P., Thomas, D. und Reddehase, M. J.,** "Control of murine cytomegalovirus in the lungs: relative but not absolute immunodominance of the immediate-early 1 nonapeptide during the antiviral cytolytic T-lymphocyte response in pulmonary infiltrates," *Journal of virology*, 1998, 7201-12.
- Holtappels, R., Gillert-Marien, D., Thomas, D., Podlech, J., Deegen, P., Herter, S., Oehrlein-Karpi, S. A., Strand, D., Wagner, M. und Reddehase, M. J.,** "Cytomegalovirus encodes a positive regulator of antigen presentation," *Journal of virology*, 2006, 7613-24.
- Holtappels, R., Grzimek, N. K. A., Simon, C. O., Thomas, D., Dreis, D. und Reddehase, M. J.,** "Processing and presentation of murine cytomegalovirus pORFm164-derived peptide in fibroblasts in the face of all viral immunosubversive early gene functions," *Journal of virology*, 2002b, 6044-53.

- Holtappels, R., Thomas, D., Podlech, J. und Reddehase, M. J.,** "Two antigenic peptides from genes m123 and m164 of murine cytomegalovirus quantitatively dominate CD8 T-cell memory in the H-2d haplotype," *Journal of virology*, 2002a, 151-64.
- Hori, S., Nomura, T. und Sakaguchi, S.,** "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3," *Science (New York, N.Y.)*, 2003, 1057-61.
- Humphreys, I. R., de Trez, C., Kinkade, A., Benedict, C. A., Croft, M. und Ware, C. F.,** "Cytomegalovirus exploits IL-10-mediated immune regulation in the salivary glands," *The Journal of experimental medicine*, 2007, 1217-25.
- Jager, A., Dardalhon, V., Sobel, R. A., Bettelli, E. und Kuchroo, V. K.,** "Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2009, 7169-77.
- Jeitziner, S. M., Walton, S. M., Torti, N. und Oxenius, A.,** "Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific effector CD4+ T cells provides antiviral protection from murine CMV infection," *European journal of immunology*, 2013, 2886-95.
- Johnson, D. C. und Hegde, N. R.,** "Inhibition of the MHC class II antigen presentation pathway by human cytomegalovirus," *Current topics in microbiology and immunology*, 2002, 101-15.
- Jones, M., Ladell, K., Wynn, K. K., Stacey, M. A., Quigley, M. F., Gostick, E., Price, D. A. und Humphreys, I. R.,** "IL-10 restricts memory T cell inflation during cytomegalovirus infection," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2010, 3583-92.
- Jonjic, S., Pavic, I., Polic, B., Crnkovic, I., Lucin, P. und Koszinowski, U. H.,** "Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus," *The Journal of experimental medicine*, 1994, 1713-7.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J. und Enk, A. H.,** "Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells," *The Journal of experimental medicine*, 2000, 1213-22.
- Jung, T. M., Gallatin, W. M., Weissman, I. L. und Dailey, M. O.,** "Down-regulation of homing receptors after T cell activation," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 1988, 4110-7.
- Kamanaka, M., Kim, S. T., Wan, Y. Y., Sutterwala, F. S., Lara-Tejero, M., Galan, J. E., Harhaj, E. und Flavell, R. A.,** "Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin tiger mouse," *Immunity*, 2006, 941-52.
- Kang, S. M., Tang, Q. und Bluestone, J. A.,** "CD4+CD25+ regulatory T cells in transplantation: progress, challenges and prospects," *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 2007, 1457-63.
- Karrer, U., Sierro, S., Wagner, M., Oxenius, A., Hengel, H., Koszinowski, U. H., Phillips, R. E. und Klennerman, P.,** "Memory inflation: continuous accumulation of antiviral CD8+ T cells over time," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2003, 2022-9.
- Kavanagh, D. G., Koszinowski, U. H. und Hill, A. B.,** "The murine cytomegalovirus immune evasion protein m4/gp34 forms biochemically distinct complexes with class I MHC at the cell surface and in a pre-Golgi compartment," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2001, 3894-902.
- Kelsey, D. K., Olsen, G. A., Overall, J. C. Jr und Glasgow, L. A.,** "Alteration of host defense mechanisms by murine cytomegalovirus infection," *Infection and immunity*, 1977, 754-60.

- Khan, W. I., Richard, M., Akiho, H., Blennerhasset, P. A., Humphreys, N. E., Grecis, R. K., Van Snick, J. und Collins, S. M.,** "Modulation of intestinal muscle contraction by interleukin-9 (IL-9) or IL-9 neutralization: correlation with worm expulsion in murine nematode infections," *Infection and immunity*, 2003, 2430-8.
- Khatti R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F.,** "An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells," *Nature immunology*, 2003, 337-42.
- Kielczewska, A., Pyzik, M., Sun, T., Krmpotic, A., Lodoen, M. B., Munks, M. W., Babic, M., Hill, A. B., Koszinowski, U. H., Jonjic, S., Lanier, L. L. und Vidal, S. M.,** "Ly49P recognition of cytomegalovirus-infected cells expressing H2-Dk and CMV-encoded m04 correlates with the NK cell antiviral response," *The Journal of experimental medicine*, 2009, 515-23.
- Kilshaw, P. J. und Murant, S. J.,** "A new surface antigen on intraepithelial lymphocytes in the intestine," *European journal of immunology*, 1990, 2201-7.
- Kotenko, S. V., Sacconi, S., Izotova, L. S., Mirochnitchenko, O. V. und Pestka, S.,** "Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10)," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 1695-700.
- Krmpotic, A., Messerle, M., Crnkovic-Mertens, I., Polic, B., Jonjic, S. und Koszinowski, U. H.,** "The immunoevasive function encoded by the mouse cytomegalovirus gene m152 protects the virus against T cell control in vivo," *The Journal of experimental medicine*, 1999, 1285-96.
- Krmpotic, A., Busch, D. H., Bubic, I., Gebhardt, F., Hengel, H., Hasan, M., Scalzo, A. A., Koszinowski, U. H. und Jonjic, S.,** "MCMV glycoprotein gp40 confers virus resistance to CD8+ T cells and NK cells in vivo," *Nature immunology*, 2002, 529-35.
- Krug, A., French, A. R., Barchet, W., Fischer, J. A. A., Dzionek, A., Pingel, J. T., Orihuela, M. M., Akira, S., Yokoyama, W. M. und Colonna, M.,** "TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function," *Immunity*, 2004, 107-19.
- Lahl, K., Loddenkemper, C., Drouin, C., Freyer, J., Arnason, J., Eberl, G., Hamann, A., Wagner, H., Huehn, J. und Sparwasser, T.,** "Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease," *The Journal of experimental medicine*, 2007, 57-63.
- Lee, K. M., Chuang, E., Griffin, M., Khattri, R., Hong, D. K., Zhang, W., Straus, D., Samelson, L. E., Thompson, C. B. und Bluestone, J. A.,** "Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4," *Science (New York, N.Y.)*, 1998, 2263-6.
- Li, Y., Liu, X., Huang, F., Zhou, H., Huang, Y. und Fang, F.,** "CD4+CD25+ regulatory T cells suppress the immune responses of mouse embryo fibroblasts to murine cytomegalovirus infection," *Immunology letters*, 2010, 131-8.
- Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, B. M., Colonna, L., Flores, M., Li, N., Schweighoffer, E., Greenberg, S., Tybulewicz, V., Vignali, D. und Clynes, R.,** "Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2008, 5916-26.
- Lim, S. P., Leung, E. und Krissansen, G. W.,** "The beta7 integrin gene (Itgb-7) promoter is responsive to TGF-beta1: defining control regions," *Immunogenetics*, 1998, 184-95.
- Ljungman, P., Deliliers, G. L., Platzbecker, U., Matthes-Martin, S., Bacigalupo, A., Einsele, H., Ullmann, J., Musso, M., Trenchel, R., Ribaud, P., Bornhauser, M., Cesaro, S., Crooks, B., Dekker, A., Gratecos, N., Klingebiel, T., Tagliaferri, E., Ullmann, A. J., Wacker, P. und Cordonnier, C.,** "Cidofovir for cytomegalovirus infection and disease in allogeneic stem cell transplant recipients. The Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation," *Blood*, 2001, 388-92.

- Lu, X., Pinto, A. K., Kelly, A. M., Cho, K. S. und Hill, A. B.,** "Murine cytomegalovirus interference with antigen presentation contributes to the inability of CD8 T cells to control virus in the salivary gland," *Journal of virology*, 2006, 4200-2.
- Mandacic, S., Walton, S. M., Rulicke, T., Richter, K., Girard-Madoux, M. J. H., Clausen, B. E., Zurunic, A., Kamanaka, M., Flavell, R. A., Jonjic, S. und Oxenius, A.,** "IL-10 suppression of NK/DC crosstalk leads to poor priming of MCMV-specific CD4 T cells and prolonged MCMV persistence," *PLoS pathogens*, 2012, e1002846.
- Manzke, N., Akhmetzyanova, I., Hasenkrug, K. J., Trilling, M., Zelinskyy, G. und Dittmer, U.,** "CD4+ T cells develop antiretroviral cytotoxic activity in the absence of regulatory T cells and CD8+ T cells," *Journal of virology*, 2013, 6306-13.
- Marshall, N. B. und Swain, S. L.,** "Cytotoxic CD4 T cells in antiviral immunity," *Journal of biomedicine and biotechnology*, 2011, 954602.
- McGuirk, P., McCann, C. und Mills, K. H. G.,** "Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*," *The Journal of experimental medicine*, 2002, 221-31.
- McHugh, R. S., Whitters, M. J., Piccirillo, C. A., Young, D. A., Shevach, E. M., Collins, M. und Byrne, M. C.,** "CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor," *Immunity*, 2002, 311-23.
- Mellor, A. L., Chandler, P., Baban, B., Hansen, A. M., Marshall, B., Pihkala, J., Waldmann, H., Cobbold, S., Adams, E. und Munn, D. H.,** "Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA4-mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase," *International immunology*, 2004, 1391-401.
- Mendelson, M., Monard, S., Sissons, P. und Sinclair, J.,** "Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors," *The Journal of general virology*, 1996, 3099-102.
- Meyers, J. D., Flournoy, N. und Thomas, E. D.,** "Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation," *The Journal of infectious diseases*, 1986, 478-88.
- Minton, E. J., Tysoe, C., Sinclair, J. H. und Sissons, J. G.,** "Human cytomegalovirus infection of the monocyte/macrophage lineage in bone marrow," *Journal of virology*, 1994, 4017-21.
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. und O'Garra, A.,** "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor," *Annual review of immunology*, 2001, 683-765.
- Moore, K. W., Vieira, P., Fiorentino, D. F., Trounstein, M. L., Khan, T. A. und Mosmann, T. R.,** "Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1," *Science (New York, N.Y.)*, 1990, 1230-4.
- Movassagh, M., Gozlan, J., Senechal, B., Baillou, C., Petit, J. C. und Lemoine, F. M.,** "Direct infection of CD34+ progenitor cells by human cytomegalovirus: evidence for inhibition of hematopoiesis and viral replication," *Blood*, 1996, 1277-83.
- Mucida, D., Pino-Lagos, K., Kim, G., Nowak, E., Benson, M. J., Kronenberg, M., Noelle, R. J. und Cheroutre, H.,** "Retinoic acid can directly promote TGF-beta-mediated Foxp3(+) Treg cell conversion of naive T cells," *Immunity*, 2009, 471-2; author reply 472-3.
- Murphy, K.P., Travers, P., Walport, M.,** *Janeway's Immunobiology, 8th ed.* ednNew York, Garland Pub, 2011.
- Mutnal, M. B., Cheeran, M. C-J, Hu, S., Little, M. R. und Lokensgard, J. R.,** "Excess neutrophil infiltration during cytomegalovirus brain infection of interleukin-10-deficient mice," *Journal of neuroimmunology*, 2010, 101-10.

- Nelson, B. H. und Willerford, D. M.**, "Biology of the interleukin-2 receptor," *Advances in immunology*, 1998, 1-81.
- Ng, T. H. Sky, Britton, Graham J., Hill, Elaine V., Verhagen, Johan, Burton, Bronwen R. und Wraith, David C.**, "Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10," *Frontiers in immunology*, 2013, 129.
- Nguyen, V. H., Shashidhar, S., Chang, D. S., Ho, L., Kambham, N., Bachmann, M., Brown, J. M. und Negrin, R. S.**, "The impact of regulatory T cells on T-cell immunity following hematopoietic cell transplantation," *Blood*, 2008, 945-53.
- Noble, A., Giorgini, A. und Leggat, J. A.**, "Cytokine-induced IL-10-secreting CD8 T cells represent a phenotypically distinct suppressor T-cell lineage," *Blood*, 2006, 4475-83.
- Oakley, O. R., Garvy, B. A., Humphreys, S., Qureshi, M. H. und Pomeroy, C.**, "Increased weight loss with reduced viral replication in interleukin-10 knock-out mice infected with murine cytomegalovirus," *Clinical and experimental immunology*, 2008, 155-64.
- Pandiyar, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. und Lenardo, M. J.**, "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells," *Nature immunology*, 2007, 1353-62.
- Peiser, L., Mukhopadhyay, S. und Gordon, S.**, "Scavenger receptors in innate immunity," *Current opinion in immunology*, 2002, 123-8.
- Plachter, B., Sinzger, C. und Jahn, G.**, "Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus," *Advances in virus research*, 1996, 195-261.
- Polic, B., Jonjic, S., Pavic, I., Crnkovic, I., Zorica, I., Hengel, H., Lucin, P. und Koszinowski, U. H.**, "Lack of MHC class I complex expression has no effect on spread and control of cytomegalovirus infection in vivo," *The Journal of general virology*, 1996, 217-25.
- Probst-Keppler, M., Geffers, R., Kroger, A., Viegas, N., Erck, C., Hecht, H-J, Lunsdorf, H., Roubin, R., Moharreggh-Khiabani, D., Wagner, K., Ocklenburg, F., Jeron, A., Garritsen, H., Arstila, T. P., Kekalainen, E., Balling, R., Hauser, H., Buer, J. und Weiss, S.**, "GARP: a key receptor controlling FOXP3 in human regulatory T cells," *Journal of cellular and molecular medicine*, 2009, 3343-57.
- Rasmussen, L., Zipeto, D., Wolitz, R. A., Dowling, A., Efron, B. und Merigan, T. C.**, "Risk for retinitis in patients with AIDS can be assessed by quantitation of threshold levels of cytomegalovirus DNA burden in blood," *The Journal of infectious diseases*, 1997, 1146-55.
- Read, S., Malmstrom, V. und Powrie, F.**, "Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation," *The Journal of experimental medicine*, 2000, 295-302.
- Reddehase, M. J., Balthesen, M., Rapp, M., Jonjic, S., Pavic, I. und Koszinowski, U. H.**, "The conditions of primary infection define the load of latent viral genome in organs and the risk of recurrent cytomegalovirus disease," *The Journal of experimental medicine*, 1994, 185-93.
- Reddehase, M. J.**, "Antigens and immuno-evasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance," *Nature reviews. Immunology*, 2002, 831-44.
- Redpath, S., Angulo, A., Gascoigne, N. R. und Ghazal, P.**, "Murine cytomegalovirus infection down-regulates MHC class II expression on macrophages by induction of IL-10," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 1999, 6701-7.
- Reusch, U., Muranyi, W., Lucin, P., Burgert, H. G., Hengel, H. und Koszinowski, U. H.**, "A cytomegalovirus glycoprotein re-routes MHC class I complexes to lysosomes for degradation," *The EMBO journal*, 1999, 1081-91.
- Risso, A.**, "Leukocyte antimicrobial peptides: multifunctional effector molecules of innate immunity," *Journal of leukocyte biology*, 2000, 785-92.

- Roers, A., Siewe, L., Strittmatter, E., Deckert, M., Schluter, D., Stenzel, W., Gruber, A. D., Krieg, T., Rajewsky, K. und Müller, W.,** "T cell-specific inactivation of the interleukin 10 gene in mice results in enhanced T cell responses but normal innate responses to lipopolysaccharide or skin irritation," *The Journal of experimental medicine*, 2004, 1289-97.
- Roncarolo, M. G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K. und Levings, M. K.,** "Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans," *Immunological reviews*, 2006, 28-50.
- Rowe, W. P., Hartley, J. W., Waterman, S., Turner, H. C. und Hueber, R. J.,** "Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids," *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 1956, 418-24.
- Rubtsov, Y. P., Rasmussen, J. P., Chi, E. Y., Fontenot, J., Castelli, L., Ye, X., Treuting, P., Siewe, L., Roers, A., Henderson, W. R., Muller, W. und Rudensky, A. Y.,** "Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces," *Immunity*, 2008, 546-58.
- Russell, J. H. und Ley, T. J.,** "Lymphocyte-mediated cytotoxicity," *Annual review of immunology*, 2002, 323-70.
- Rutella, S., Bonanno, G., Procoli, A., Mariotti, A., de Ritis, D. G., Curti, A., Danese, S., Pessina, G., Pandolfi, S., Natoni, F., Di Febo, A., Scambia, G., Manfredini, R., Salati, S., Ferrari, S., Pierelli, L., Leone, G. und Lemoli, R. M.,** "Hepatocyte growth factor favors monocyte differentiation into regulatory interleukin (IL)-10++IL-12low/neg accessory cells with dendritic-cell features," *Blood*, 2006, 218-27.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. und Toda, M.,** "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 1995, 1151-64.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., Kuniyasu, Y., Nomura, T., Toda, M. und Takahashi, T.,** "Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance," *Immunological reviews*, 2001, 18-32.
- Sakaguchi, S. und Sakaguchi, N.,** "Animal models of arthritis caused by systemic alteration of the immune system," *Current opinion in immunology*, 2005, 589-94.
- Sarris, M., Andersen, K. G., Randow, F., Mayr, L. und Betz, A. G.,** "Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition," *Immunity*, 2008, 402-13.
- Scalzo, A. A.,** "Successful control of viruses by NK cells--a balance of opposing forces?" *Trends in microbiology*, 2002, 470-4.
- Schleiss, M. R.,** "Cytomegalovirus vaccine development," *Current topics in microbiology and immunology*, 2008, 361-82.
- Schmetterer, K. G., Neunkirchner, A. und Pickl, W. F.,** "Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation," *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2012, 2253-76.
- Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R. und Melief, C. J.,** "T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions," *Nature*, 1998, 480-3.

- Schwele, S., Fischer, A. M., Brestrich, G., Wlodarski, M. W., Wagner, L., Schmueck, M., Roemhild, A., Thomas, S., Hammer, M. H., Babel, N., Kurtz, A., Maciejewski, J. P., Reinke, P. und Volk, H-D,** "Cytomegalovirus-specific regulatory and effector T cells share TCR clonality--possible relation to repetitive CMV infections," *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 2012, 669-81.
- Shevach, E. M.,** "Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression," *Immunity*, 2009, 636-45.
- Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y. und Sakaguchi, S.,** "Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance," *Nature immunology*, 2002, 135-42.
- Sinzger, C. und Jahn, G.,** "Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis," *Intervirology*, 1996, 302-19.
- Smith, H. R. C., Heusel, J. W., Mehta, I. K., Kim, S., Dorner, B. G., Naidenko, O. V., Iizuka, K., Furukawa, H., Beckman, D. L., Pingel, J. T., Scalzo, A. A., Fremont, D. H. und Yokoyama, W. M.,** "Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 8826-31.
- Smith, M. G.,** "Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease," *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 1956, 424-30.
- Smith, M. G.,** "Propagation of salivary gland virus of the mouse in tissue cultures," *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 1954, 435-40.
- Smyth, M. J. und Trapani, J. A.,** "Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis," *Immunology today*, 1995, 202-6.
- Snyder, C. M., Cho, K. S., Bonnett, E. L., van Dommelen, S., Shellam, G. R. und Hill, A. B.,** "Memory inflation during chronic viral infection is maintained by continuous production of short-lived, functional T cells," *Immunity*, 2008, 650-9.
- Spector, S. A., Wong, R., Hsia, K., Pilcher, M. und Stempien, M. J.,** "Plasma cytomegalovirus (CMV) DNA load predicts CMV disease and survival in AIDS patients," *The Journal of clinical investigation*, 1998, 497-502.
- Stacey, M. A., Marsden, M., Wang, E. C. Y., Wilkinson, G. W. G. und Humphreys, I. R.,** "IL-10 restricts activation-induced death of NK cells during acute murine cytomegalovirus infection," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2011, 2944-52.
- Stoddart, C. A., Cardin, R. D., Boname, J. M., Manning, W. C., Abenes, G. B. und Mocarski, E. S.,** "Peripheral blood mononuclear phagocytes mediate dissemination of murine cytomegalovirus," *Journal of virology*, 1994, 6243-53.
- Su, H. C., Nguyen, K. B., Salazar-Mather, T. P., Ruzek, M. C., Dalod, M. Y. und Biron, C. A.,** "NK cell functions restrain T cell responses during viral infections," *European journal of immunology*, 2001, 3048-55.
- Suffia, I., Reckling, S. K., Salay, G. und Belkaid, Y.,** "A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of Leishmania major infection," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2005, 5444-55.
- Sun, C.-M., Hall, J. A., Blank, R. B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J. R. und Belkaid, Y.,** "Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid," *The Journal of experimental medicine*, 2007, 1775-85.

- Sungur, C. M., Tang-Feldman, Y. J., Ames, E., Alvarez, M., Chen, M., Longo, D. L., Pomeroy, C. und Murphy, W. J.,** "Murine natural killer cell licensing and regulation by T regulatory cells in viral responses," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 7401-6.
- Swain, S. L., McKinstry, K. K. und Strutt, T. M.,** "Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses," *Nature reviews. Immunology*, 2012, 136-48.
- Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J., Alexopoulou, L., Flavell, R. A. und Beutler, B.,** "Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 3516-21.
- Tan, C. und Gery, I.,** "The unique features of Th9 cells and their products," *Critical reviews in immunology*, 2012, 1-10.
- Tang-Feldman, Y. J., Lochhead, G. R., Lochhead, S. R., Yu, C. und Pomeroy, C.,** "Interleukin-10 repletion suppresses pro-inflammatory cytokines and decreases liver pathology without altering viral replication in murine cytomegalovirus (MCMV)-infected IL-10 knockout mice," *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society. [et al.]*, 2011, 233-43.
- Taniguchi, T.,** "Structure and function of IL-2 and IL-2 receptors," *Behring Institute Mitteilungen*, 1992, 87-95.
- Tatura, R., Zeschnigk, M., Adamzik, M., Probst-Kepper, M., Buer, J. und Kehrmann, J.,** "Quantification of regulatory T cells in septic patients by real-time PCR-based methylation assay and flow cytometry," *PloS one*, 2012, e49962.
- Taylor, Gregory H.,** "Cytomegalovirus," *American family physician*, 2003, 519-24.
- Tenorio, E. P., Fernandez, J., Castellanos, C., Olguin, J. E. und Saavedra, R.,** "CD4+ Foxp3+ regulatory T cells mediate Toxoplasma gondii-induced T-cell suppression through an IL-2-related mechanism but independently of IL-10," *European journal of immunology*, 2011, 3529-41.
- Thale, R., Szepan, U., Hengel, H., Geginat, G., Lucin, P. und Koszinowski, U. H.,** "Identification of the mouse cytomegalovirus genomic region affecting major histocompatibility complex class I molecule transport," *Journal of virology*, 1995, 6098-105.
- Thornton, A. M. und Shevach, E. M.,** "Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2000, 183-90.
- Tyms, A. S., Davis, J. M., Jeffries, D. J. und Meyers, J. D.,** "BWB759U, an analogue of acyclovir, inhibits human cytomegalovirus in vitro," *Lancet*, 1984, 924-5.
- Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmbj, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C. und Stockinger, B.,** "Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset," *Nature immunology*, 2008, 1341-6.
- Vieira, P. L., Christensen, J. R., Minaee, S., O'Neill, E. J., Barrat, F. J., Boonstra, A., Barthlott, T., Stockinger, B., Wraith, D. C. und O'Garra, A.,** "IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2004, 5986-93.
- Vignali, D. A. A., Collison, L. W. und Workman, C. J.,** "How regulatory T cells work," *Nature reviews. Immunology*, 2008, 523-32.

- von Laer, D., Meyer-Koenig, U., Serr, A., Finke, J., Kanz, L., Fauser, A. A., Neumann-Haefelin, D., Brugger, W. und Hufert, F. T., "Detection of cytomegalovirus DNA in CD34+ cells from blood and bone marrow," *Blood*, 1995, 4086-90.
- Walker, L. S. K. und Abbas, A. K., "The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery," *Nature reviews. Immunology*, 2002, 11-9.
- Weiner, H. L., "Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells," *Immunological reviews*, 2001, 207-14.
- Weiss, J. M., Bilate, A. M., Gobert, M., Ding, Y., Curotto de Lafaille, M. A., Parkhurst, C. N., Xiong, H., Dolpady, J., Frey, A. B., Ruocco, M. G., Yang, Y., Floess, S., Huehn, J., Oh, S., Li, M. O., Niec, R. E., Rudensky, A. Y., Dustin, M. L., Littman, D. R. und Lafaille, J. J., "Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells," *The Journal of experimental medicine*, 2012, 1723-42, S1.
- Weller, T. H., Hanshaw, J. B. und Scott, D. E., "Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease," *Virology*, 1960, 130-2.
- Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T. und Sakaguchi, S., "CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function," *Science (New York, N.Y.)*, 2008, 271-5.
- Xystrakis, E., Dejean, A. S., Bernard, I., Druet, P., Liblau, R., Gonzalez-Dunia, D. und Saoudi, A., "Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation," *Blood*, 2004, 3294-301.
- Yadav, M., Louvet, C., Davini, D., Gardner, J. M., Martinez-Llordella, M., Bailey-Bucktrout, S., Anthony, B. A., Sverdrup, F. M., Head, R., Kuster, D. J., Ruminski, P., Weiss, D., Von Schack, D. und Bluestone, J. A., "Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo," *The Journal of experimental medicine*, 2012, 1713-22, S1-19.
- Ye, M. und Graf, T., "Early decisions in lymphoid development," *Current opinion in immunology*, 2007, 123-8.
- Yewdell, J. W. und Hill, A. B., "Viral interference with antigen presentation," *Nature immunology*, 2002, 1019-25.
- Zandvliet, M. L., Falkenburg, J. H. F., Jedema, I., Willemze, R., Guchelaar, H.-J. und Meij, P., "Detailed analysis of IFN γ response upon activation permits efficient isolation of cytomegalovirus-specific CD8+ T cells for adoptive immunotherapy," *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, 2009, 513-23.
- Zhang, S., Zhang, H. und Zhao, J. "The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation," *Biochemical and biophysical research communications*, 2009, 405-8.
- Zheng, Y., Valdez, P. A., Danilenko, D. M., Hu, Y., Sa, S. M., Gong, Q., Abbas, A. R., Modrusan, Z., Ghilardi, N., de Sauvage, F. J. und Ouyang, W., "Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens," *Nature medicine*, 2008, 282-9.
- Zhou, L., Ivanov, I. I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D. E., Leonard, W. J. und Littman, D. R., "IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways," *Nature immunology*, 2007, 967-74.
- Zhu, J. und Paul, W. E., "Heterogeneity and plasticity of T helper cells," *Cell research*, 2010, 4-12.
- Ziegler, H., Muranyi, W., Burgert, H. G., Kremmer, E. und Koszinowski, U. H., "The luminal part of the murine cytomegalovirus glycoprotein gp40 catalyzes the retention of MHC class I molecules," *The EMBO journal*, 2000, 870-81.

Ziegler, H., Thale, R., Lucin, P., Muranyi, W., Flohr, T., Hengel, H., Farrell, H., Rawlinson, W. und Koszinowski, U. H., "A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/cis-Golgi compartments," *Immunity*, 1997, 57-66.

Ziegler, S. F., "FOXP3: not just for regulatory T cells anymore," *European journal of immunology*, 2007, 21-3.

7 Verzeichnisse

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin (Farbstoff)
APC	engl. <i>antigen presenting cell</i> , antigenpräsentierende Zelle (Zelltyp)
AICD	engl. <i>activation induced cell death</i> , Aktivierungs-induzierter Zelltod
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i> , Differenzierungskluster
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CMV	Cytomegalievirus
CT-Wert	engl. <i>cycle threshold</i> , Fluoreszenzschwellenwert
CTL	engl. <i>cytotoxic T-lymphocyte</i> , Zytotoxischer T-Lymphozyt
CTLA-4	engl. <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
Cre	engl. <i>cyclization recombination</i>
d	engl. <i>day</i> , Tag
DC	engl. <i>dendritic cell</i> , Dendritische Zelle
DEPC-H ₂ O	Diethyldicarbonat-Wasser
DEREG	engl. <i>DEpletion of REgulatory T-cells</i>
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
DNA	engl. <i>Deoxyribonucleicacid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's <i>Modified Eagle</i> Medium
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNase	Deoxyribonuclease
DT	Diphtherie-Toxin
eGFP	engl. <i>enhanced-green fluorescent protein</i> , verbessertes grün-fluoreszierendes Protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl. <i>enzyme-linked immunosorbant assay</i>
EMEM	Eagle's <i>Minimum Essential</i> Medium
ER	Endoplasmatisches Retikulum
engl.	englisch
et al.	lat. <i>et altera</i> , und andere
FACS	engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i> , Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung

FCS	engl. <i>fetal calf serum</i> , Fötales Kälberserum
FIC	Fox-IRES-Cre
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Foxp3	engl. <i>forkhead box protein P3</i>
FSC	engl. <i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
GFP	engl. <i>green fluorescent protein</i> , grün-fluoreszierendes Protein
GvHD	engl. <i>graft versus host disease</i>
Gzm	Granzym
h	lat. <i>hora</i> , Stunde
hCMV	humanes Cytomegalievirus
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
IFN γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IL	Interleukin
IMDM	Iscoe's <i>Modified</i> Dulbecco's Medium
IPEX-Syndrom	engl. <i>immundysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome</i>
iTregs	induzierte regulatorische T-Zellen
IVC	engl. <i>individual ventilated cage</i> , individuell ventilierter Käfig
KO	engl. <i>knock-out</i>
lat.	lateinisch
Lag-3	engl. <i>lymphocyte activation gene 3</i>
LPA	Lineares Polyacrylamid
MACS	engl. <i>magnetic activated cell sorting</i>
mCMV	murines Cytomegalievirus
MEF	Maus-embryonale Fibroblasten
MFI	engl. <i>mean fluorescent intensity</i> , durchschnittliche Fluoreszenzintensität
MHC	engl. <i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitäts-Komplex
m	milli
M	Molar
min	Minute
n	Stichprobenumfang
NF κ B	engl. <i>nuclear factor kappa of activated B-cells</i>

NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
ns	nicht signifikant
nTregs	natürliche regulatorische T-Zellen
Nrp-1	Neuropilin-1
PB	Pacific Blue
PBS	engl. <i>phosphate buffer solution</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PFU	engl. <i>plaque forming unit</i> , Plaque-formende Einheit
p.i.	engl. <i>post infection</i> , nach der Infektion
PMA	engl. <i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PRR	engl. <i>pattern recognition receptors</i> , Mustererkennungsrezeptoren
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RPS9	Ribosomales Protein 9
RT	Reverse Transkription
ROR	engl. <i>retinoid related orphan receptor</i>
SCID	engl. <i>severe combined immunodeficient</i> , schwerer kombinierter Immundefekt
sek	Sekunde
SPF	spezifisch-pathogen-frei
SSC	engl. <i>sideward scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
T _A	Annealing Temperatur
Tab.	Tabelle
T-bet	engl. <i>T-box transcription factor expressed in T-cells</i>
TCR	engl. <i>T-cell receptor</i> , T-Zell-Rezeptor
TE	Tris/EDTA
TGF- β	engl. <i>transforming growth factor-β</i>
T _H	T-Helfer Zellen
TLR	engl. <i>toll like receptor</i> , Toll-ähnlicher Rezeptor
TNF	engl. <i>tumor necrosis factor</i> , Tumornekrosefaktor
T _R 1	regulatorische T-Zelle Typ 1
Treg	regulatorische T-Zelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ü.N.	über Nacht
WT	Wildtyp

Zur Benennung der Aminosäuren wurde der Einbuchstabencode verwendet.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Suppressionsmechanismen regulatorischer T-Zellen auf T-Zellen.....	17
Abb. 1.2: Suppressionsmechanismen regulatorischer T-Zellen auf Dendritische Zellen.....	18
Abb. 1.3: Eulenaugenzelle während einer hCMV-Infektion.....	20
Abb. 3.1: Milzgewicht und T-Zellaktivierungsstatus über den Verlauf der akuten mCMV-Infektion.....	51
Abb. 3.2: Anteil GzmB-exprimierender T-Zellen während der akuten mCMV-Infektion.....	52
Abb. 3.3: Anteil an IFN γ -produzierenden CD4 ⁺ T-Zellen im Verlauf der akuten mCMV- Infektion.....	53
Abb. 3.4: Anteil an IFN γ -produzierenden CD8 ⁺ T-Zellen im Verlauf der akuten mCMV- Infektion.....	54
Abb. 3.5: Viruslast während der akuten mCMV-Infektion in der Lunge und den Speicheldrüsen.....	55
Abb. 3.6: Anteil und Phänotyp Foxp3 ⁺ CD4 ⁺ regulatorischer T-Zellen im Verlauf der akuten mCMV-Infektion.....	56
Abb. 3.7: Anreicherungsstrategie für Responder- und Effektor- und Treg-Zellen für einen Proliferations- oder Suppressionstest.....	58
Abb. 3.8: Suppressionseigenschaften regulatorischer T-Zellen während einer akuten mCMV- Infektion.....	59
Abb. 3.9: Proliferationseigenschaften von Effektor T-Zellen während einer akuten mCMV- Infektion.....	60
Abb. 3.10: Depletion von Foxp3 ⁺ CD4 ⁺ Zellen in DEREK-Mäusen während der akuten mCMV-Infektion.....	61
Abb. 3.11: Erhöhte Milzgewichte und T-Zellaktivierung über den Verlauf der akuten mCMV- Infektion nach Treg-Depletion.....	62
Abb. 3.12: Verstärkte Expression von GzmB auf T-Zellen in Treg-depletierten Mäusen sieben Tage nach mCMV-Infektion.....	63
Abb. 3.13: Erhöhte Anzahl IFN γ -produzierender CD4 ⁺ T-Zellen in Treg-depletierten Mäusen 7 d.p.i.....	64
Abb. 3.14: Anteil IFN γ -produzierender CD8 ⁺ T-Zellen in Treg-depletierten Mäusen 7 d.p.i.....	65
Abb. 3.15: Erhöhte IFN γ -Serumspiegel in Treg-depletierten Mäusen während der akuten mCMV-Infektion.....	66

Abb. 3.16: GzmB-exprimierende NK-Zellen während der akuten mCMV-Infektion nach Treg-Depletion	67
Abb. 3.17: Viruslast in der Lunge und den Speicheldrüsen nach Treg-Depletion 7 d.p.i.	68
Abb. 3.18: Expression von IL-10 während der akuten mCMV-Infektion in CD4 ⁺ T-Zellen	70
Abb. 3.19: Erhöhte IL-10 Genexpression in CD4 ⁺ T-Zellen und Tregs sieben Tage nach mCMV-Infektion	71
Abb. 3.20: Expression von IL-10 während der akuten mCMV-Infektion in CD8 ⁺ T-Zellen	71
Abb. 3.21: Expression von IL-10 während der akuten mCMV-Infektion in B-Zellen	72
Abb. 3.22: Milzgewichte nach T-Zellspezifischer IL-10-Inaktivierung bei akuter mCMV-Infektion	73
Abb. 3.23: T-Zellaktivierungsstatus nach T-Zellspezifischer IL-10-Inaktivierung bei akuter mCMV-Infektion	74
Abb. 3.24: IFN γ -Expression in CD4 ⁺ T-Zellen nach T-Zellspezifischer IL-10-Inaktivierung bei akuter mCMV-Infektion	75
Abb. 3.25: IFN γ -Expression in CD8 ⁺ T-Zellen nach T-Zellspezifischer IL-10-Inaktivierung bei akuter mCMV-Infektion	76
Abb. 3.26: Viruslast während der akuten mCMV-Infektion bei Mäusen mit T-Zellspezifischer IL-10-Inaktivierung	77
Abb. 3.27: MHC-II Expression auf DCs während der akuten mCMV-Infektion nach T-Zell-spezifischer IL-10 Inaktivierung	78
Abb. 3.28: Treg-spezifische Inaktivierung von IL-10	79
Abb. 3.29: Milzgewichte und GzmB-Expression nach Treg-spezifischer IL-10-Inaktivierung bei akuter mCMV-Infektion	80
Abb. 3.30: IFN γ -Expression nach Treg-spezifischer IL-10-Inaktivierung bei akuter mCMV-Infektion	81
Abb. 3.31: Viruslast während der akuten mCMV-Infektion bei Mäusen mit Treg-spezifischer IL-10-Inaktivierung	82

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Chemikalien	32
Tab. 2.2: Primer	36
Tab. 2.3: Antikörper	36
Tab. 2.4: Fluorochrome	37
Tab. 2.5: Geräte	38
Tab. 2.6: Oligonukleotidprimerpaare zur Genotypisierung transgener Mauslinien	40

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Danksagung

Sehr herzlich bedanke ich mich bei...

...Frau Prof. Dr. Wiebke Hansen für ihre Geduld und fürsorgliche Betreuung. Danke für Deine andauernde Motivation, professionelle und herzliche Unterstützung während der gesamten Zeit dieser Arbeit.

...Prof. Dr. Jörg Timm für die freundliche Übernahme des Korreferats.

...Prof. Dr. Jan Buer, dass ich meine Doktorarbeit in seinem Institut durchführen konnte.

...Prof. Dr. Astrid Westendorf für die netten Diskussionen und wertvollen Tipps.

...Prof. Dr. Hartmut Hengel und Dr. Albert Zimmermann für die Unterstützung und freundlichen Diskussionen.

...dem gesamten Graduiertenkolleg 1045. Die Zeit mit euch war klasse!

...allen Arbeitsgruppen des Instituts für Medizinische Mikrobiologie. Ich habe mich sehr wohl gefühlt.

...besonders meiner Arbeitsgruppe: Simone, Marina und Christina, für die tolle Zusammenarbeit, Unterstützung und so manches aufmunternde Gespräch. Caro, die so manche Maus bearbeitet hat.

...dem Team vom Sorter: Witold und Patrick, für die sauberen Zellen.

...den Bürokollegen aus der alten Bibliothek. Es war schön mit euch.

...meinen Eltern für die immerwährende Unterstützung während der gesamten Zeit meines Studiums.

...meiner lieben Frau Kathinka, ohne Dich hätte ich das nicht so gut geschafft. Ich liebe Dich!

Danke!

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Charakterisierung und Modifikation regulatorischer T-Zellen während der mCMV-Infektion“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Nils Hagen Jost befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den _____
Prof. Dr. Wiebke Hansen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) und e) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____
Nils Hagen Jost

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) und f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/ Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____
Nils Hagen Jost